

BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

CONCEPTOS
Y EXPERIMENTOS

CUARTA EDICIÓN

GERALD KARP

Mc
Graw
Hill

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

Introducción al estudio de la biología celular

- 1-1 Descubrimiento de las células
- 1-2 Propiedades básicas de las células
- 1-3 Dos tipos fundamentalmente diferentes de células
- 1-4 Virus

La perspectiva humana: Búsqueda de una vacuna contra el SIDA

La vía experimental: Priones: solución de un enigma médico



FIGURA 1-1A. Micrografía electrónica de exploración de agregados celulares del moho del fango *Dictyostelium discoideum* en el proceso de formación de corpúsculos fructificantes. (Cortesía de Mark Grimson, Texas Tech. University.)

Las células, y las estructuras que las forman, son demasiado pequeñas para verlas, escucharlas o tocarlas directamente. Pero a pesar de este tremendo inconveniente, las células son tema de miles de publicaciones cada año, y prácticamente se han investigado todos los aspectos de su minúscula estructura. De muchas maneras, el estudio de la biología celular constituye un tributo a la curiosidad humana en su aspiración de realizar descubrimientos, y a la inteligencia creativa del ser humano para diseñar los complejos instrumentos y las elaboradas técnicas mediante las cuales se pueden efectuar esos descubrimientos. Esto no significa que los biólogos celulares sean los únicos dotados con estos nobles rasgos. En un extremo del espectro científico los astrónomos estudian objetos en la orilla más alejada del universo con propiedades muy diferentes a las que se encuentran sobre la tierra. Y en el otro extremo del espectro, los físicos nucleares dirigen su atención sobre partículas de dimensiones subatómicas que tienen igualmente propiedades inconcebibles. Es muy claro, por lo tanto, que nuestro universo contiene mundos dentro de otros mundos, y el estudio de todos sus aspectos es fascinante. En este sentido, la finalidad más aparente de este texto es generar entre sus lectores el interés por las células y por su estudio.

1-1 Descubrimiento de las células

No se sabe cuándo el ser humano descubrió por primera vez la notable propiedad de una superficie curva de vidrio para inclinar la luz y formar imágenes. Los anteojos se fabricaron por primera vez en Europa en el siglo XIII y el primer microscopio compuesto (de dos lentes) fue construido a fines del siglo XVI. A mediados del siglo XVII un puñado de científicos pioneros había utilizado sus microscopios caseros para descubrir un mundo que nunca se había revelado al ojo desnudo. El descubrimiento de las células (fig. 1-1) generalmente se acredita a Robert Hooke, microscopista inglés quien a los

27 años de edad fue premiado con el puesto de Guardián de la Royal Society, la academia científica más antigua de Inglaterra. Una de las muchas cuestiones que Hooke intentó responder fue: ¿por qué los tapones hechos de corcho (una parte del árbol de alcornoque) eran tan adecuados para retener aire dentro de una botella? En sus propias palabras: “tomé un buen pedazo de corcho limpio y con un cuchillo tan bien afilado como una navaja de rasurar lo corté en pedazos y ...luego lo examiné con el microscopio. Me pareció percibir que tenía una apariencia porosa... muy parecida a un panal de abejas”. Hooke llamó a los poros *celdillas* debido a que le recordaban las celdas habitadas por los monjes que vivían en un monasterio. En realidad, Hooke había observado las paredes vacías de un tejido vegetal muerto, paredes que originalmente fueron producidas por las células vivas que las rodeaban.

Entre tanto, Anton van Leeuwenhoek, un holandés que se ganaba la vida vendiendo telas y botones, ocupaba sus ratos de ocio tallando lentes y construyendo microscopios

de notable calidad. Durante 50 años, Leeuwenhoek envió cartas a la Royal Society de Londres describiendo sus observaciones microscópicas, junto con un vago discurso acerca de sus hábitos cotidianos y su estado de salud. Leeuwenhoek fue el primero en examinar una gota de agua del estanque y observar sorprendido la abundante cantidad de “animalillos” microscópicos que iban y venían ante sus ojos. También fue el primero en describir las diferentes formas de bacterias que obtuvo de agua en la cual había remojado pimienta y también material raspado de sus propios dientes. Sus primeras cartas a la Royal Society describiendo este mundo previamente jamás visto despertaron tal escepticismo que la Sociedad despachó a su Guardián, Robert Hooke, para confirmar las observaciones. Hooke hizo el viaje y pronto Leeuwenhoek fue una celebridad mundial, y recibió la visita en Holanda de Pedro el Grande de Rusia y de la reina de Inglaterra.

No fue sino hasta el decenio de 1830 que se comprobó la gran importancia de las células. En 1838, Matthias Schleiden, abogado alemán convertido en botánico, concluyó que a pesar de diferencias en la estructura de diferentes tipos, las plantas estaban constituidas de células y que el embrión de la planta tuvo su origen en una sola célula. En 1839, Theodor Schwann, zoólogo alemán y colega de Schleiden, publicó un trabajo muy completo acerca de las bases celulares de la vida animal. Schwann concluyó que las células de las plantas y los animales eran estructuras semejantes y propuso el primero de los dos dogmas de la teoría celular:

- Todos los organismos están compuestos de una o más células
- La célula es la unidad estructural de la vida.

Las ideas de Schleiden y de Schwann acerca del origen de las células fueron menos profundas; ambos concluyeron que las células podrían originarse de materiales no celulares. Dada la posición prominente que estos dos investigadores tenían en el mundo científico, tuvieron que pasar muchos años antes que las observaciones de otros biólogos fueran aceptadas como demostración de que las células no se originan de esa manera y que los organismos tampoco se producen por generación espontánea. Para 1855, Rudolf Virchow, patólogo alemán, propuso una hipótesis convincente para el tercer dogma de la teoría celular:

- Las células sólo pueden originarse por división de una célula preexistente.

1-2 Propiedades básicas de las células

Así como las plantas y los animales son seres vivos, también lo son las células. De hecho, la vida es la propiedad fundamental de las células y ellas son las unidades más pequeñas que muestran esta propiedad. A diferencia de las partes de una célula, que simplemente se deterioran cuando se aíslan, las células pueden ser extraídas de una planta o de un animal y cultivar en el laboratorio, donde crecen y se reproducen durante tiempo prolongado. El primer cultivo de células



FIGURA 1-1. Descubrimiento de las células. Microscopio empleado por Robert Hooke, con lámpara y condensador para iluminar el objeto. (Recuadro) Dibujo hecho por Hooke de un corte delgado de corcho que muestra una red de “celdillas” semejante a un panal de abejas. (De Granger Collection; recuadro del archivo Bettmann.)

humanas fue iniciado por George Gey, de la Universidad Johns Hopkins, en 1951. Se emplearon células obtenidas de un tumor maligno denominadas células HeLa, por su donador Henrietta Lacks. Las células HeLa, descendientes por división celular de la primera célula muestra, todavía se desarrollan en la actualidad en laboratorios alrededor del mundo (fig. 1-2). Debido a que son mucho más fáciles de estudiar que las células situadas dentro del cuerpo, las células cultivadas *in vitro* (en cultivo fuera del cuerpo) se han convertido en una herramienta esencial de la biología celular y molecular. En realidad, gran parte de la información que analizaremos en este libro se obtuvo utilizando células desarrolladas en cultivos de laboratorio.

Iniciaremos nuestra exploración de las células examinando algunas de sus propiedades más fundamentales.

Las células muestran complejidad y organización elevadas

La complejidad es una propiedad evidente pero difícil de describir. En este momento podemos pensar en la complejidad en términos de orden y regularidad. Cuanto más compleja sea una estructura, mayor el número de partes que deben estar en posición apropiada, menor la tolerancia de errores en la naturaleza e interacción de las partes, y mayor la regulación o control que se debe ejercer para conservar el sistema. A lo largo de este libro tendremos ocasión de considerar la complejidad de la vida a diferentes niveles. Analizaremos la organización de los átomos en moléculas de tamaño pequeño, la organización de estas moléculas en polímeros gigantes y la organización de diferentes tipos de moléculas poliméricas en complejos que a su vez se organizan en organelos subcelulares y finalmente en células. Como se verá, hay una gran regularidad en cada nivel. Cada tipo de célula tiene apariencia consistente en el microscopio electrónico; o sea, sus organelos tienen forma y situación particular en cada individuo de una especie y de una especie a otra. De manera similar, cada tipo de organelo tiene composición concordante de macromoléculas, las cuales están dispuestas en un patrón predecible. Consideremos las células que revisten el intestino encargadas de eliminar nutrientes del conducto digestivo (fig. 1-3). Se puede predecir que los extremos apicales de las células que revisten el conducto intestinal poseen largas prolongaciones (*microvellosidades*) para facilitar la absorción de nutrientes, en tanto que sus extremos basales contienen un gran número de mitocondrias que suministran la energía necesaria como combustible para los diferentes procesos de transporte a través de las membranas. Las microvellosidades pueden prolongarse hacia afuera de la superficie apical de la célula debido a que contienen un esqueleto interno de filamentos, que a su vez están compuestos de la proteína *actina* dispuesta en forma regular de doble hélice. Cada mitocondria está compuesta por un patrón característico de membranas internas, que por su parte constan de una disposición regular de proteínas, incluyendo enzimas sintetizadoras de ATP proyectadas desde la membrana interna como una pelota sobre una varilla. Cada uno de estos diferentes niveles de organización se ilustra en la serie de recuadros de la figura 1-3.

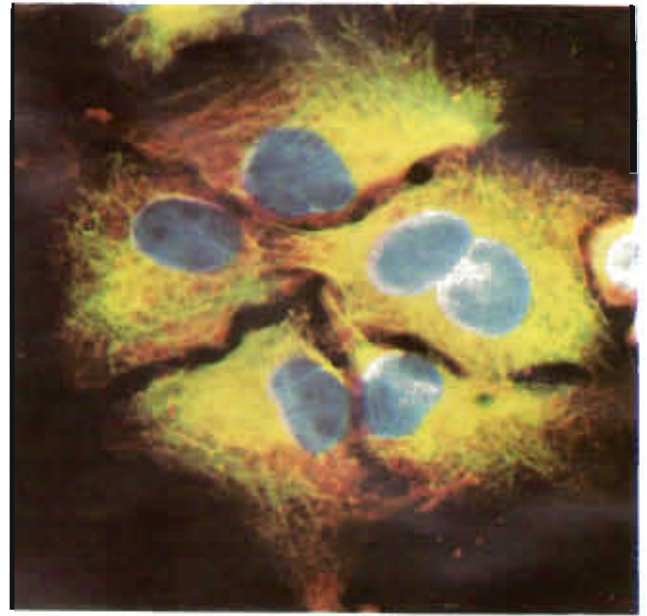


FIGURA 1-2. Células HeLa, como las representadas aquí, fueron las primeras células humanas conservadas en cultivo durante largos periodos y que todavía se encuentran en uso en la actualidad. A diferencia de las células normales, que tienen un periodo de vida finito en cultivo, las células (como las HeLa) derivadas de tumores cancerosos pueden vivir indefinidamente en cultivo en tanto las condiciones sean favorables para apoyar su crecimiento y división. (Nancy Keadersha/Photo Researchers.)

Afortunadamente para la célula y los biólogos moleculares, la evolución tiende a moverse más bien lentamente hacia los niveles de organización biológica con los cuales debemos tratar. Por ejemplo, aunque un ser humano y un gato tienen características anatómicas muy diferentes, las células que forman sus tejidos y los organelos que constituyen sus células son muy similares. El filamento de actina mostrado en la figura 1-3, recuadro 3, y la enzima sintetizadora de ATP del recuadro 6 son prácticamente idénticos a las estructuras similares que se observan en organismos tan diversos como levaduras, pájaros y árboles de pino rojo. La información obtenida por el estudio de las células de un tipo de organismo casi siempre tiene aplicación directa en otras formas de vida. Muchos de los procesos más básicos, como la síntesis de proteínas, la conservación de la energía química, o la construcción de una membrana, son notablemente similares en todos los organismos vivos.

Las células poseen un programa genético y los recursos para aplicarlo

Los organismos se generan a partir de la información codificada en un conjunto de genes. El programa genético humano contiene suficiente información, si se convirtiera a palabras, para llenar millones de páginas de texto. Lo más sorprendente es que esta vasta cantidad de información se encuentra empacada en un conjunto de cromosomas que

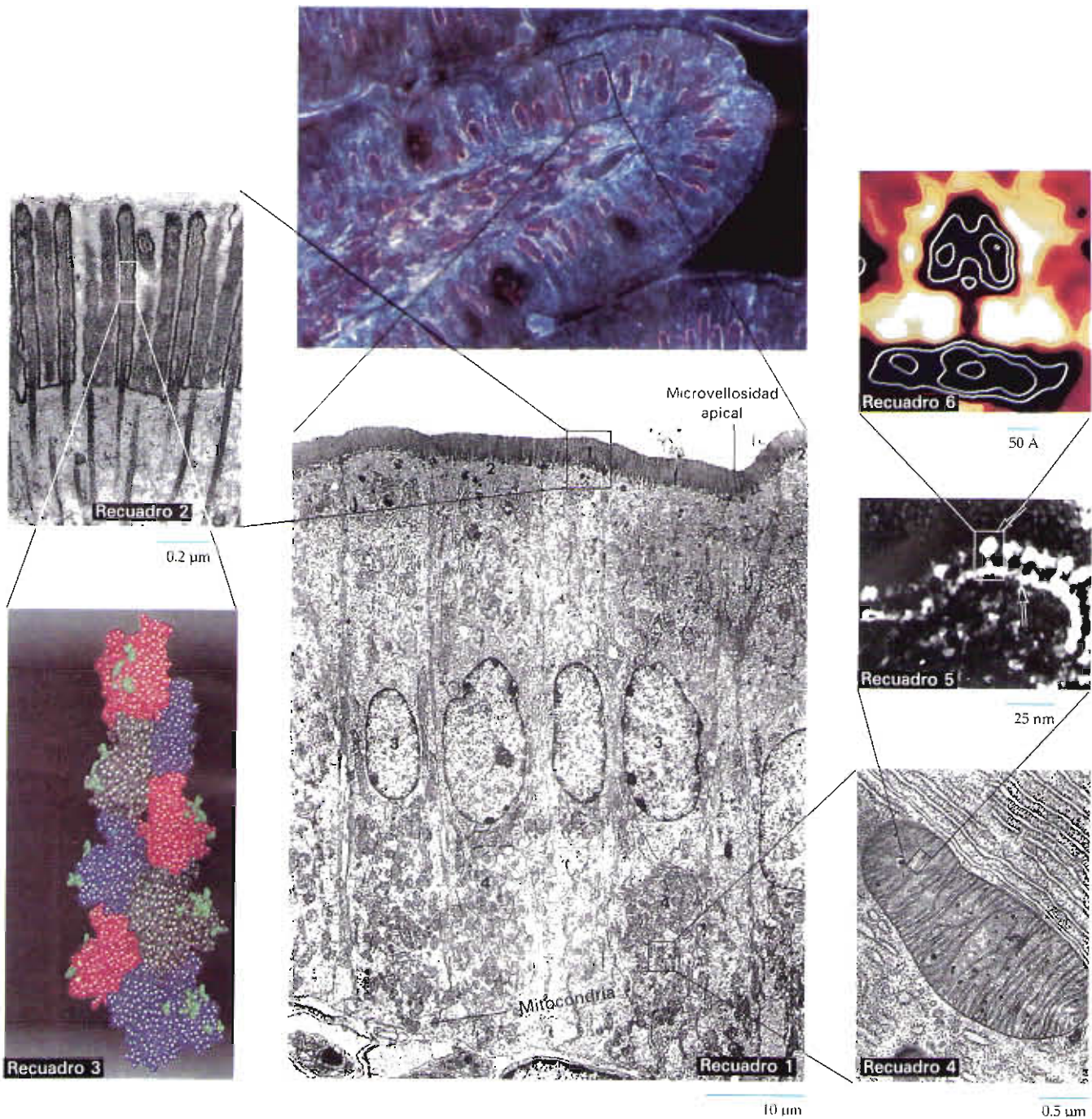


FIGURA 1-3. Niveles de organización celular y molecular. Las fotografías de brillantes colores de un corte teñido muestran la estructura microscópica de una vellosidad de la pared del intestino delgado según se observa con el microscopio de luz. El recuadro 1 muestra una micrografía electrónica de la capa epitelial de células que revisten la pared interna del intestino. La superficie apical de cada célula, que mira hacia el conducto intestinal, contiene numerosas microvellosidades que participan en la absorción de nutrientes. La región basal de cada célula contiene un gran número de mitocondrias donde la célula dispone de energía. El recuadro 2 muestra la región apical de las microvellosidades; se puede observar que cada microvellosidad contiene un haz de microfilamentos. El recuadro 3 muestra la doble fila de moléculas de proteína actina que constituyen cada filamento. En el recuadro 4 se muestra una mitocondria individual similar a las observadas en la región basal de las células epiteliales; el recuadro 5 muestra una parte de la membrana interna de la mitocondria, incluyendo partículas pediculadas (flecha de arriba) que se prolongan a partir de la membrana (flecha de abajo) y corresponden a los sitios donde se sintetiza ATP; el recuadro 6 muestra un modelo molecular del aparato sintetizador de ATP que se analiza en mayor extensión en el capítulo 5. (Micrografía de luz, Cecil Fox/Photo Researchers; recuadro 1 cortesía de Shakti P. Kapur, Georgetown University Medical Center; recuadro 2 cortesía de Mark S. Mooseker y Lewis G. Tilney, J. Cell Biol. 67:729, 1975, con permiso de la Rockefeller University Press; recuadro 3 cortesía de Kenneth C. Holmes; recuadro 4 cortesía de Keith R. Porter/Photo Researchers; recuadro 5 cortesía de Humberto Fernandez-Moran; recuadro 6 cortesía de Roderick A. Capaldi.)

ocupa el espacio de un núcleo celular, miles de veces más pequeño que el punto sobre esta letra *i*.

Los genes son algo más que gavetas para almacenar información: constituyen las plantillas para construir estructuras celulares, y contienen instrucciones para poner en marcha las actividades de la célula y el programa para reproducirse a sí mismos. Descubrir los mecanismos mediante los cuales las células emplean su información genética para efectuar estas funciones es uno de los más grandes logros de la ciencia en los últimos años.

Las células tienen capacidad para reproducirse a sí mismas

Así como se generan nuevos individuos por reproducción, lo mismo ocurre con las células nuevas. Las células se producen por división, proceso en el cual el contenido de una célula "madre" se distribuye entre dos células "hijas". Antes de la división, el material genético se duplica con toda fidelidad y cada célula hija recibe una dotación completa e igual de información genética. En la mayor parte de los casos, las dos células hijas producidas durante la división poseen aproximadamente el mismo volumen. Sin embargo, en algunos casos, como ocurre durante la división del oocito humano, una de las células puede retener casi todo el citoplasma aunque reciba sólo la mitad del material genético (fig. 1-4).

Las células captan y consumen energía

El desarrollo y la operación de funciones complejas requiere el ingreso continuo de energía (fig. 1-5). Prácticamente toda la energía que requiere la vida del planeta proviene en último término de la radiación electromagnética del sol. Los pigmentos que absorben luz presentes en las membranas de células fotosintéticas atrapan la energía de la luz. La energía lumínica se convierte por fotosíntesis en energía química almacenada en carbohidratos ricos en energía, como la sucrosa o el almidón. La energía atrapada en estas moléculas durante la fotosíntesis suministra el combustible que sirve para poner en marcha casi todas las actividades de los organismos sobre la tierra. A la mayor parte de las células animales la energía les llega ya empaquetada, por lo general en forma del azúcar glucosa. En el ser humano, el hígado libera glucosa a la sangre y este azúcar circula a través del cuerpo suministrando energía química a todas las células. Una vez dentro de la célula, la glucosa se descompone en tal forma que su contenido energético se puede almacenar en una forma rápidamente disponible (de ordinario como ATP), que posteriormente se emplea para poner en marcha las múltiples actividades que requieren energía dentro de la célula.

Las células efectúan variadas reacciones químicas

Las células funcionan como plantas químicas en miniatura. Incluso la célula bacteriana más sencilla es capaz de



20 μ m

FIGURA 1-4. Reproducción celular. Este huevo de mamífero sufrió recientemente una división celular bastante desigual en la cual la mayor parte del citoplasma quedó retenida dentro del huevo grande, en tanto que la otra célula sólo consta casi exclusivamente de material nuclear en su totalidad (indicado por los cromosomas teñidos de azul). (Cortesía de Jonathan van Blerkom.)

efectuar cientos de diferentes transformaciones químicas, ninguna de las cuales ocurre a una tasa significativa en el mundo inanimado. Prácticamente todos los cambios químicos que ocurren en las células requieren enzimas: moléculas que incrementan mucho la velocidad de una reacción química. La suma total de las reacciones químicas que ocurren dentro de una célula representa el **metabolismo** celular.

Las células participan en numerosas actividades mecánicas

Las células son sitios de actividad infatigable. Los materiales son transportados de un sitio a otro, se sintetizan y descomponen con rapidez algunas estructuras, y en muchos casos toda la célula se desplaza de un lugar a otro (fig. 1-6). Estas diferentes actividades dependen de cambios mecánicos dinámicos que ocurren en el interior de la célula, la



FIGURA 1-5. Captación de energía. Una célula viva del alga filamentosa *Spirogyra*. El cloroplasto en forma de listón que se observa en zig-zag a través de la célula es el sitio donde se captura la energía de la luz solar y se convierte en energía química durante la fotosíntesis. (M.I. Walker/Photo Researchers, Inc.)

mayor parte iniciados por alteraciones en la forma de ciertas proteínas “motoras”.

Las células tienen capacidad para responder a los estímulos

Algunas células presentan respuestas obvias a los estímulos; por ejemplo, una célula ciliada única se aparta de un objeto situado en su camino o se desplaza hacia una fuente de nutrientes. Las células dentro de una planta o animal multicelular responden a los estímulos en forma menos evidente, pero de todas maneras responden. La mayor parte de las células están cubiertas con *receptores* que interactúan con las sustancias del medio de manera muy específica. Las células poseen receptores a hormonas, factores de crecimiento, materiales extracelulares y también sustancias situadas en la superficie de otras células. Los receptores de una célula constituyen una puerta de entrada a través de la cual los agentes externos pueden generar respuestas específicas. A veces las células responden a un estímulo específico alterando sus actividades metabólicas, preparándose para la división celular, desplazándose de un lugar a otro o incluso “suicidándose”.

Las células tienen capacidad de autorregulación

Además de sus necesidades energéticas para mantener un estado complejo ordenado se requiere regulación continua. Igual que en el cuerpo íntegro, dentro de cada célula viva operan muchos mecanismos de control diferentes. La importancia de los mecanismos reguladores de la célula es más evidente cuando fallan. Por ejemplo, la insuficiencia de la célula para corregir un error cuando duplica su DNA puede



FIGURA 1-6. Locomoción celular. Este fibroblasto (tipo de célula de tejido conectivo) fue sorprendido en el acto de desplazarse sobre la superficie de una caja de cultivo. La célula está teñida con anticuerpos fluorescentes para revelar la distribución de los filamentos de actina y los microtúbulos (cap. 9). El borde redondeado de la célula va por delante; los agrupamientos de filamentos de actina en el borde delantero son sitios donde se genera la fuerza del movimiento. (Cortesía de J. Victor Small.)

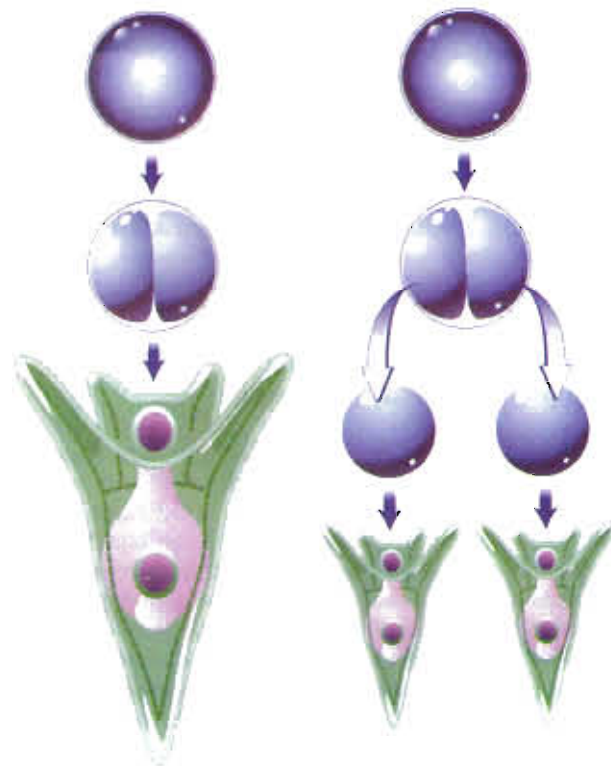


FIGURA 1-7. Autorregulación. El diagrama de la izquierda muestra el desarrollo normal de un erizo de mar en el cual un huevo fertilizado da lugar a un solo embrión. El esquema de la derecha muestra un experimento en el cual se separan entre sí las células de un embrión después de la primera división y se permite que cada célula se desarrolle por su cuenta. En vez de desarrollarse en la mitad de un embrión como ocurriría si no se le hubiera alterado, cada célula aislada reconoce la ausencia de su vecino y regula su desarrollo para formar un embrión completo (aunque más pequeño).

producir una mutación nociva o trastornos en el control del crecimiento celular que pueden transformar a la célula en una célula cancerosa con capacidad para destruir a todo el organismo. Poco a poco hemos aprendido cada vez más acerca de cómo la célula controla sus actividades, pero aún queda mucho más por descubrir. Consideremos el siguiente experimento efectuado en 1891 por el embriólogo alemán Hans Driesch, quien observó que podía separar por completo las primeras dos o cuatro células del embrión de un erizo de mar y cada una de las células aisladas proseguía su desarrollo hasta convertirse en embriones normales (fig. 1-7). ¿Cómo puede una célula normalmente destinada sólo a formar parte de un embrión regular sus propias actividades y formar otro embrión entero? ¿Cómo puede la célula aislada reconocer la ausencia de sus células vecinas y de qué manera este hecho puede reorientar el curso del desarrollo celular? ¿Cómo puede la parte de un embrión adquirir el sentido de totalidad? En la actualidad no estamos en mejor posición para responder estas preguntas, planteadas hace más de 200 años cuando se efectuó el experimento.

A lo largo de este libro analizaremos procesos que requieren una serie de pasos ordenados, muy semejantes a la línea de ensamblado para construir automóviles en la cual

Máquina exprimidora para jugo de naranja

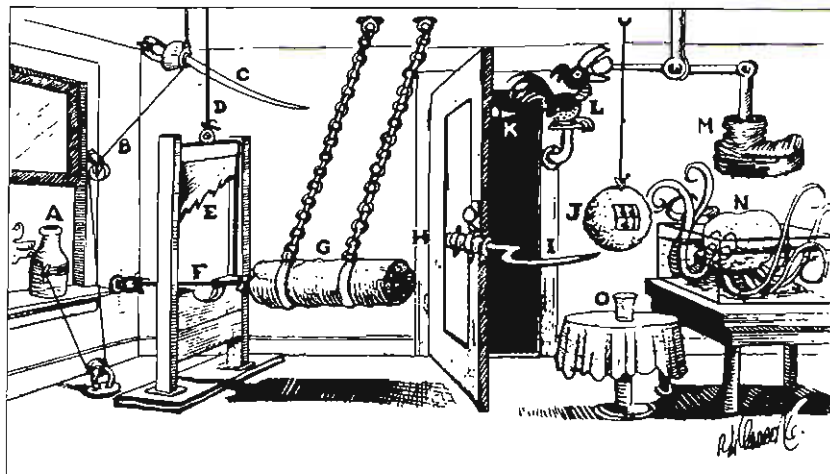


FIGURA 1-8. Las actividades de la célula con frecuencia son análogas a esta máquina de Rube Goldberg, en la cual un paso “automático” dispara el siguiente paso en una reacción secuencial. La figura 15-27 suministra un buen ejemplo de este concepto. (Reimpreso con permiso especial de King Features Syndicate.)

El profesor Butts cayó por el foso abierto de un elevador y cuando llegó tierra abajo sólo encontró una máquina para exprimir naranjas. El lechero toma la botella de leche vacía (A) y tira de la cuerda (B), lo que provoca que la espada (C) corte la cuerda (D). Esto permite que la hoja de la guillotina (E) caiga y corte la soga (F), que libera el ariete de tronco (G). El ariete golpea la puerta abierta (H) y la cierra. La hoz (I) corta la naranja (J), y al mismo tiempo la espina (K) hiere al “halcón-ciruelero” (L). Este

abre la boca gritando de dolor y por lo tanto suelta la ciruela y permite que el zapato (M) caiga y se zambulla sobre la cabeza de un pulpo (N). El pulpo despierta iracundo y ve la cara del buzo dibujada sobre la naranja, la ataca y la oprime con sus tentáculos, de esta manera el jugo de la naranja cae al vaso (O).

Posteriormente el tronco puede emplearse para construir una cabaña en donde puede desarrollarse su hijo, quien podrá ser presidente como Abraham Lincoln.

los trabajadores añaden, quitan o hacen ajustes específicos conforme el automóvil se mueve a lo largo de la línea. En la célula, la plantilla para elaborar productos se encuentra en los ácidos nucleicos y los trabajadores que los construyen son principalmente proteínas. La presencia de estos dos tipos de macromoléculas, más que cualquier otro factor, confiere a la química de la célula sus características distintivas únicas diferentes del mundo no vivo. En la célula, los trabajadores deben actuar sin la ventaja de un control externo. Cada paso del proceso debe ocurrir de manera espontánea y en forma tal que el siguiente paso se inicie automáticamente. Toda la información para dirigir una actividad particular, sea la síntesis de una proteína, la secreción de una hormona o la contracción de una fibra muscular, ya debe estar presente dentro del propio sistema. En gran medida, las funciones de una célula operan de manera análoga al artefacto inventado por el profesor Butts para exprimir naranjas que se muestra en la figura 1-8.

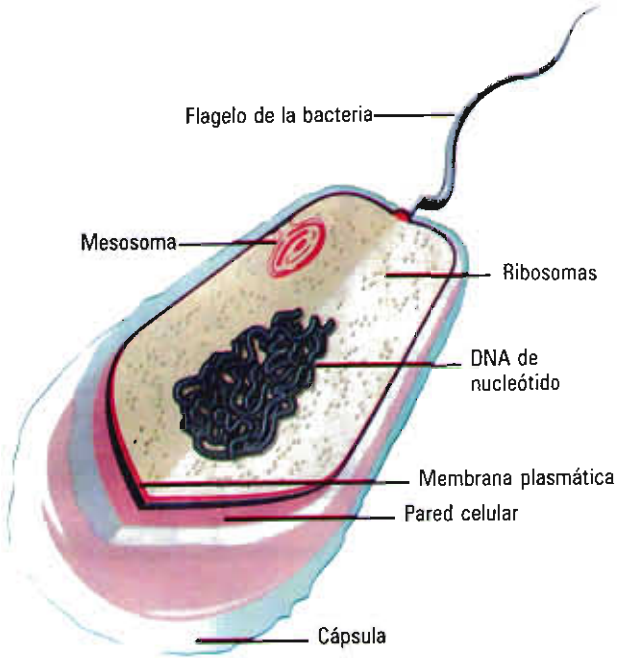
1-3 Dos tipos fundamentalmente diferentes de células

Cuando el microscopio electrónico estuvo disponible en casi todo el mundo, los biólogos pudieron examinar la estructura interna de una gran variedad de células. Estos estudios revelaron que hay dos tipos básicos de células, procariotas

y eucariotas, que pueden distinguirse por su tamaño y el tipo de sus estructuras internas u **organelos** que contienen (fig. 1-9). La existencia de dos tipos distintos de células, sin intermediarios conocidos, representa una de las más fundamentales brechas de discontinuidad en la evolución del mundo biológico. Las **células procariotas**, estructuralmente más simples, sólo se encuentran entre las bacterias y recíprocamente todas las bacterias constan de células procariotas. Todos los otros tipos de organismos: protistas, hongos, plantas y animales, constan estructuralmente de **células eucariotas** más complejas. Las células procariotas vivas en la actualidad son notablemente semejantes a las células fosilizadas que se encuentran en rocas desde Australia hasta Sudáfrica y que datan de hace más de 3 500 millones de años (fig. 1-10). En realidad, se piensa que las células procariotas fueron los únicos seres vivos sobre el planeta durante casi 2 000 millones de años antes de la aparición de los primeros eucariotes.

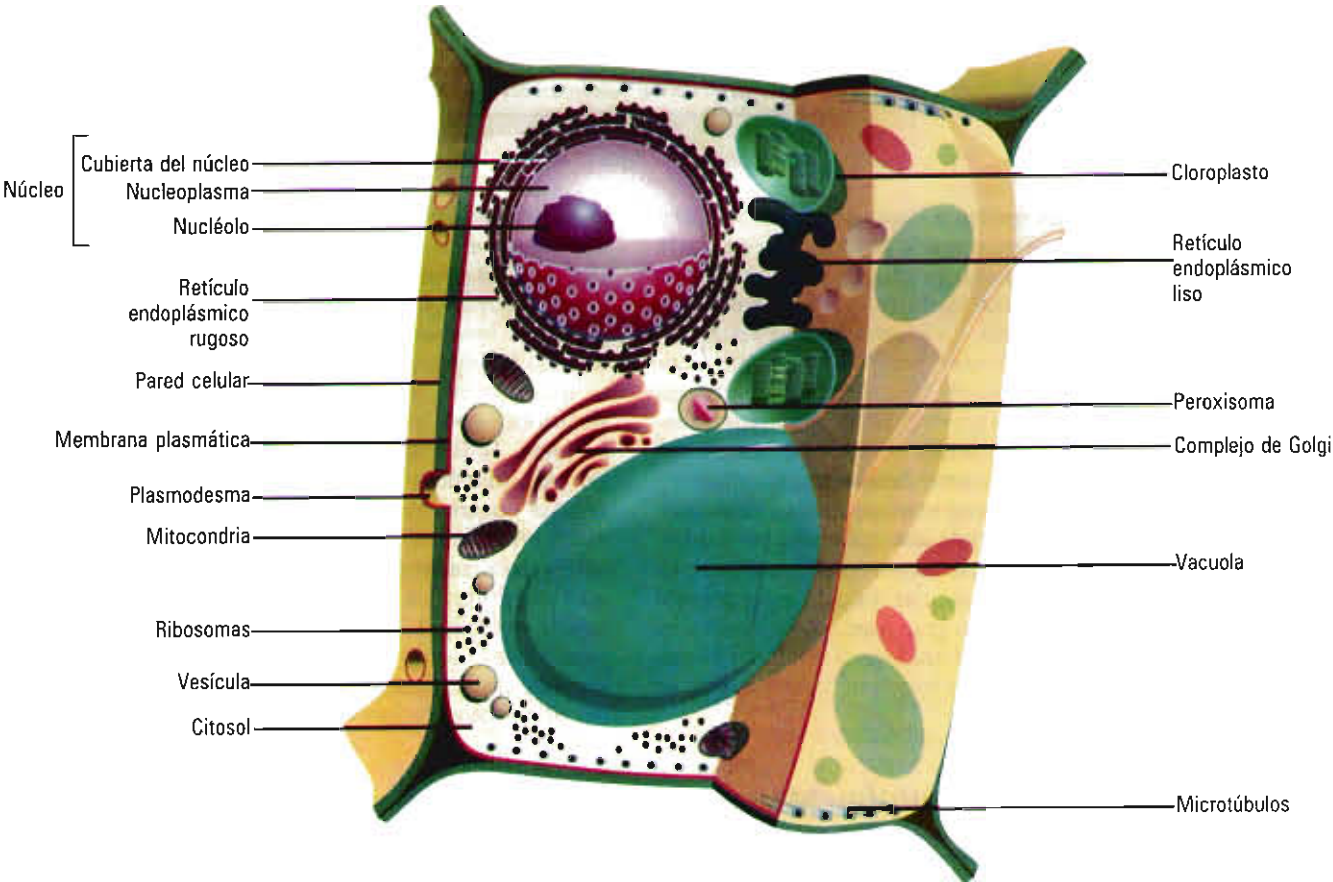
Características que distinguen a las células procariotas y a las eucariotas

La siguiente comparación breve entre células eucariotas y procariotas revela muchas diferencias básicas, pero también similitudes (fig. 1-9). Las similitudes reflejan el hecho de que las células eucariotas casi con certeza evolucionaron

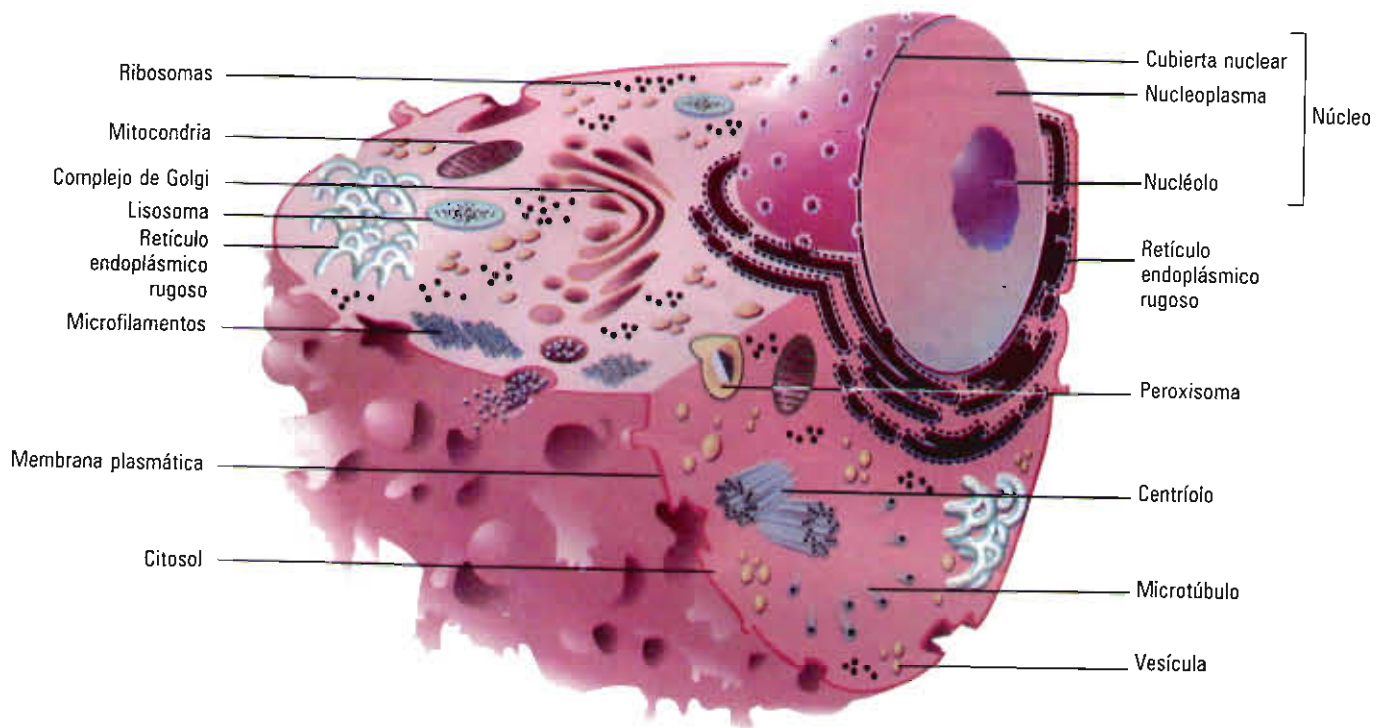


(a)

FIGURA 1-9. La estructura de la célula. Diagramas esquemáticos de una bacteria "generalizada" (a), vegetal (b) y animal (c). Nótese que los organelos no están dibujados a escala.



(b)



(c)

FIGURA 1-9. Continuación.

a partir de ancestros procariotes. Debido a su linaje común, ambos tipos de células comparten un lenguaje genético idéntico, un conjunto común de vías metabólicas y muchos rasgos estructurales comunes. Por ejemplo, ambos tipos de células están rodeadas por una membrana plasmática de estructura similar que sirve como barrera selectivamente permeable entre los mundos vivo y no vivo. Ambos tipos

de células pueden rodearse de una *pared celular* rígida, no viva, que protege la delicada forma de vida de su interior. Aunque las paredes celulares de los procariotes y los eucariotes pueden tener funciones semejantes, su composición química es muy diferente.

Internamente, las células eucariotas son mucho más complejas, tanto estructural como funcionalmente, en comparación con las células procariotas (fig. 1-9). Ambas contienen una región nuclear que alberga el material genético de la célula, rodeada de citoplasma. El material genético de una célula procariota se encuentra en un **nucleoide**, región de la célula mal demarcada que carece de membrana limitante para separarla del citoplasma que la rodea. Por lo contrario, las células eucariotas poseen un **núcleo**, una región rodeada por una estructura membranosa compleja denominada *cubierta nuclear*. Esta diferencia en la estructura del núcleo es la base de los términos *procariote* (*pro*, antes; *carion*, núcleo) y *eucariote* (*eu*, verdadero; *carion*, núcleo). Las células procariotas contienen cantidades relativamente pequeñas de DNA: la longitud total del DNA de una bacteria oscila entre 0.25 mm y casi 3 mm, cantidad suficiente para codificar unos pocos miles de proteínas. Aunque las células eucariotas más simples sólo poseen un poco más de DNA (4.6 mm en las levaduras) que los procariotes más complejos, la mayor parte de las células eucariotas (incluso las de microorganismos eucariotes) contienen varios órdenes de magnitud más de información genética. Ambos tipos de células poseen cromosomas dentro del DNA, pero numerosos cromosomas de una célula eucariota constan de fibras

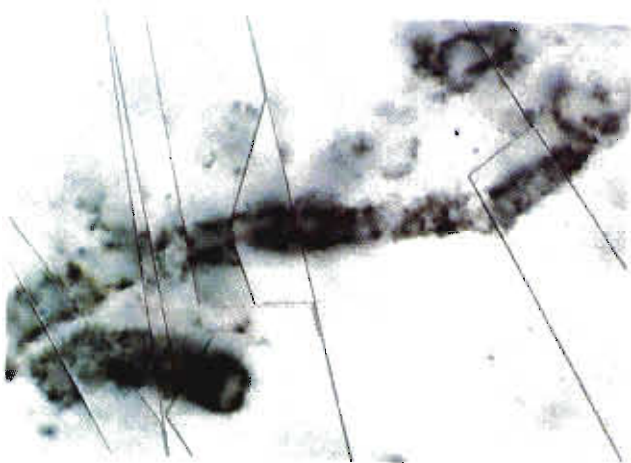
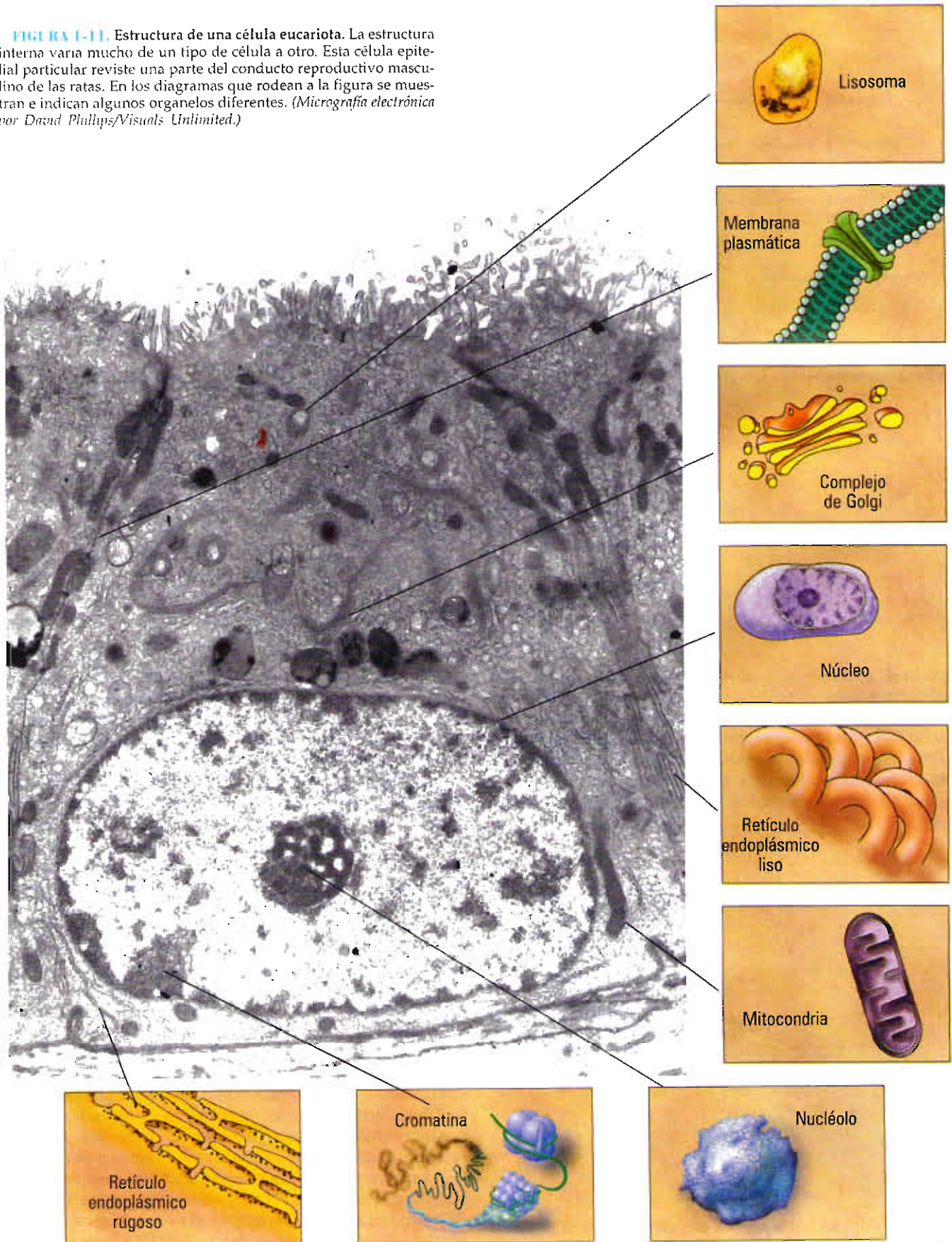


FIGURA 1-10. La forma de vida más antigua sobre el planeta. Molde de una cianobacteria filamentososa de 3 500 millones de años de edad tomada en el oeste de Australia. (Cortesía de S.M. Awramik.)

FIGURA 1-11. Estructura de una célula eucariota. La estructura interna varía mucho de un tipo de célula a otro. Esta célula epitelial particular reviste una parte del conducto reproductivo masculino de las ratas. En los diagramas que rodean a la figura se muestran e indican algunos organelos diferentes. (Micrografía electrónica por David Phillips/Visuals Unlimited.)



que contienen DNA y proteína. **en tanto que** el cromosoma único de una célula procariota prácticamente sólo contiene DNA “desnudo”.

El citoplasma de los dos tipos de células también es muy diferente. El citoplasma de una célula eucariota contiene una gran diversidad de **estructuras**, como puede observarse con **facilidad** por el examen más superficial de una **micrografía electrónica** de casi cualquier célula eucariota (fig. 1-11). Lo más notable es que las células eucariotas contienen un **arreglo de organelos** membranosos cubiertos por membranas. Por ejemplo, en condiciones típicas, las células animales y las vegetales contienen mitocondrias, donde se encuentra disponible la energía química para abastecer de **combustible** a todas las actividades celulares; un **retículo endoplásmico**, donde se elaboran la mayor parte de los lípidos y proteínas de las células; complejos Golgi, donde los materiales se clasifican, modifican y envían a su destino celular específico; y una gran variedad de vesículas simples de dimensiones variables envueltas por membranas. Las células vegetales contienen organelos membranosos adicionales, incluyendo cloroplastos, que son sitios de la fotosíntesis y con frecuencia una sola vacuola grande que a veces ocupa la mayor parte del volumen celular. Consideradas en conjunto, las membranas de la célula eucariota sirven para dividir el citoplasma en compartimientos dentro de los cuales pueden efectuarse actividades especializadas. Por lo contrario, el citoplasma de las células procariotas está prácticamente desprovisto de estructuras membranosas. Las excepciones a esta generalización incluyen a los **mesosomas**, derivados de pliegues simples de la membrana plasmática (fig. 1-9), y las membranas fotosintéticas complejas de las cianobacterias (fig. 1-15).

Las membranas citoplásmicas de las células eucariotas forman un sistema de conductos y vesículas interconectadas cuya función es dirigir el transporte de sustancias de una parte a otra de la célula y también entre el interior de la célula y su entorno. Debido a su pequeño tamaño, la comunicación intracitoplásmica dirigida tiene menor importancia en las células procariotas, donde los movimientos necesarios de materiales se pueden efectuar por simple difusión.

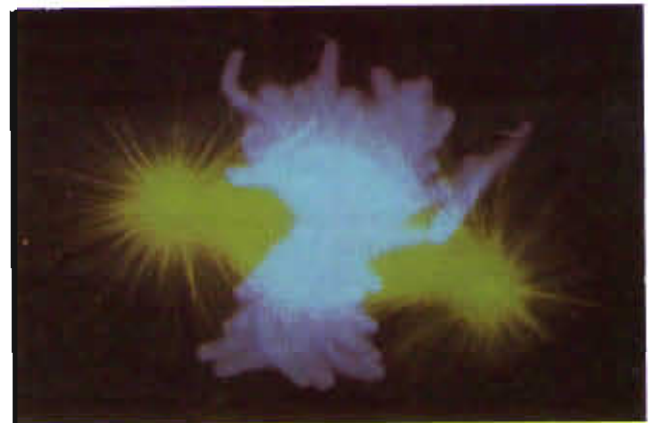
Las células eucariotas también contienen numerosas estructuras que carecen de membrana. En este grupo se incluyen los túbulos alargados y filamentos del citoesqueleto que participan en la contractilidad y los movimientos de la célula, y también sirven como apoyo. Las células procariotas en general carecen de estructuras comparables. Sin embargo, tanto las células eucariotas como las procariotas poseen ribosomas que son partículas no membranosas que funcionan como “mesas de trabajo” sobre las cuales se elaboran las proteínas celulares. Aunque los ribosomas de las células procariotas y eucariotas tienen dimensiones considerablemente diferentes (los ribosomas de los procariotes son más pequeños y contienen menor número de elementos), estos organelos participan en el ensamblado de proteínas mediante un mecanismo similar en ambos tipos de células.

Se pueden observar otras diferencias importantes entre las células eucariotas y las procariotas. Las células eucariotas se dividen por un complicado proceso de mitosis en el cual los cromosomas duplicados se condensan en estructu-

ras compactas y son separados por un elaborado aparato que contiene microtúbulos (fig. 1-12). En los procariotes, el cromosoma no se condensa y tampoco hay aparato fusiforme. El DNA se duplica y las dos copias simplemente se separan por el crecimiento de una membrana celular interpuesta. Este mecanismo de división más simple permite a las células procariotas proliferar a una velocidad mucho más rápida que las células eucariotas; una población de bacterias bien alimentada puede duplicar su número cada 20 a 40 minutos.

Los procariotes en su mayor parte son microorganismos asexuados. Sólo contienen una copia de su único cromosoma y no cuentan con ningún proceso comparable a la meiosis, formación de gameto o verdadera fertilización. Aunque no hay verdadera reproducción sexual entre los procariotes, algunos son capaces de **conjugación**, en la cual un fragmento de DNA pasa de una célula a otra (fig. 1-13). Sin embargo, la célula receptora casi nunca recibe un cromosoma completo del donador y la situación en la cual la célula receptora contiene tanto su propio DNA como el de su pareja es fugaz. La célula pronto vuelve a la situación en la cual posee un solo cromosoma.

Aunque las células eucariotas poseen gran variedad de complejos mecanismos locomotores, los correspondientes a los procariotes son muy simples. El movimiento de una célula procariota se puede efectuar mediante un delgado filamento proteínico denominado **flagelo**, que sobresale de la célula y posee movimientos de rotación (fig. 1-14, a). Los giros del flagelo ejercen presión contra el líquido que lo rodea y como resultado la célula avanza hacia adelante. Ciertas células eucariotas, incluyendo muchos protistas y células espermáticas, también poseen flagelos, pero la versión eucariota es mucho más complicada que el simple filamento



4 μm

FIGURA 1-12. La división celular en los eucariotes requiere el ensamblado de un aparato especializado separador de cromosomas denominado huso mitótico, construido principalmente de microtúbulos cilíndricos. En esta micrografía los microtúbulos aparecen de color verde debido a que se unen específicamente a un anticuerpo relacionado con un colorante verde fluorescente. Los cromosomas, que casi estaban separados en dos células hijas cuando se fijó esta célula, están teñidos de azul. (Cortesía de Conly L. Rieder.)



FIGURA 1-13. Conjugación bacteriana. Micrografía electrónica que muestra bacterias “macho” y “hembra” unidas por una estructura procedente de la célula macho, denominada *F pilus*, a través de la cual le pasa DNA a la hembra. (Cortesía de Charles C. Brinton.)

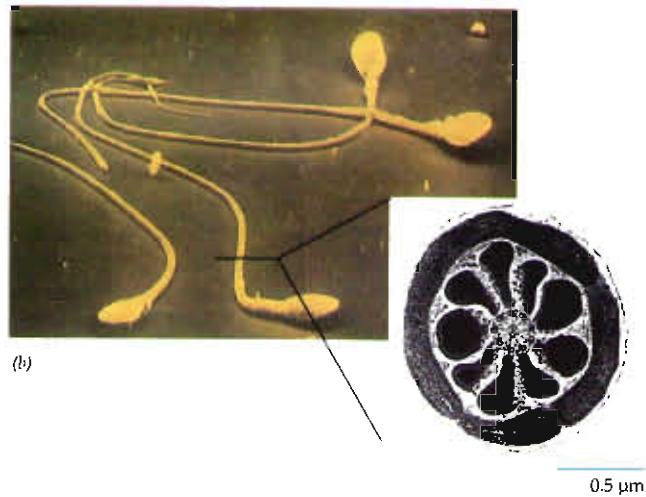
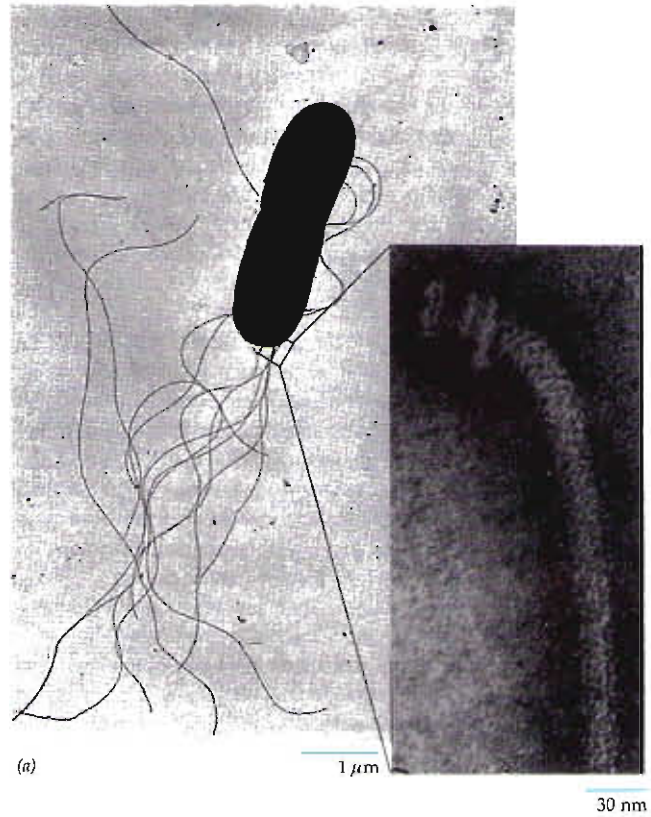


FIGURA 1-14. Diferencia entre flagelados procariotas y eucariotas. a) La bacteria *Salmonella* con sus numerosos flagelos. El recuadro muestra una vista muy ampliada de una parte del flagelo bacteriano único, que consta principalmente de una sola proteína denominada flagelina. b) Cada uno de estos espermatozoides humanos está provisto de movimientos ondulatorios efectuados con un solo flagelo. El recuadro muestra una sección transversal del flagelo de un espermatozoide que revela una estructura compleja que consta de cientos de proteínas diferentes. (a: Según Bernard R. Gerber, Lewis M. Routledge y Shiro Takashima, J. Mol. Biol. 71:322, 1972, copyright: Academic Press, Inc.; recuadro cortesía de Julius Adler y M.L. DePamphilis; b: micrografía cortesía de David M. Phillips/Visuals Unlimited, recuadro cortesía de Don W. Fawcett.)

proteínico de la bacteria y emplea mecanismos diferentes para generar movimiento (fig. 1-14, b).

En los párrafos precedentes se mencionaron muchas de las diferencias más importantes entre los niveles procariota y eucariota de organización celular. En los siguientes capítulos ampliaremos muchos de esos puntos. Antes de calificar a los procariotes como “inferiores” hay que recordar que estos microorganismos han permanecido sobre la tierra durante más de 3 000 millones de años, y en este mismo instante millones de ellos se están adhiriendo a la superficie externa de nuestro propio cuerpo y compartiendo los nutrientes en nuestro conducto digestivo. También debemos considerar que metabólicamente los procariotes son microorganismos muy especializados. Por ejemplo, una bacteria como *Escherichia coli*, habitante común del conducto digestivo del ser humano y de las placas de cultivo en los laborato-

rios, tiene la capacidad de vivir y prosperar en un medio que sólo contiene alguna fuente de carbono y nitrógeno y unos cuantos iones inorgánicos. Estas células bacterianas contienen todas las enzimas necesarias para convertir uno o dos compuestos orgánicos de bajo peso molecular en cientos de sustancias que la célula debe contener. Otras bacterias son capaces de vivir con una "dieta" a base de puras sustancias inorgánicas. Por lo contrario, incluso las células metabólicamente mejor dotadas de nuestro cuerpo requieren gran variedad de compuestos orgánicos, incluyendo numerosas vitaminas y otras sustancias esenciales que no pueden elaborar por sí mismas. En realidad, muchos de estos ingredientes dietéticos esenciales son producidos por bacterias que normalmente viven en el intestino grueso.

Tipos de células procariotas

Según los esquemas actuales de clasificación, los procariotes se dividen en dos grupos principales o subreinos: las arqueobacterias y las eubacterias. Las arqueobacterias incluyen tres grupos de bacterias primitivas cuyos vínculos evolutivos entre sí se manifiestan por la similitud en la secuencia de nucleótidos de sus ácidos nucleicos. Las arqueobacterias vivas están representadas por los metanógenos [bacterias capaces de convertir el CO_2 y el gas de H_2 a gas metano (CH_4)]; los halófilos (bacterias que viven en medios sumamente salinos, como el Mar Muerto o el Gran Lago Salado), y los termoacidófilos (bacterias que viven en manantiales calientes y muy ácidos). Se piensa que las arqueobacterias incluyen a los parientes vivos más cercanos de las primeras células que evolucionaron sobre la tierra.

Todos los otros tipos de bacterias se clasifican en el subreino Eubacteria. Este subreino incluye la célula viva más pequeña, el micoplasma ($0.2 \mu\text{m}$ de diámetro) que es también el único procariote que carece de pared celular. Los procariotes más complejos son las cianobacterias (antiguamente conocidas como algas azules debido a la espuma verde azulosa que pueden formar en la superficie de lagos y estanques). Las cianobacterias contienen arreglos muy elaborados de membranas citoplásmicas que sirven como sitios para la fotosíntesis (fig. 1-15, a). Las membranas citoplásmicas de las cianobacterias son muy similares a las membranas fotosintéticas presentes en los cloroplastos de las células vegetales.

Igual que las plantas y a diferencia de otras bacterias, en las cianobacterias la fotosíntesis se efectúa por desdoblamiento de moléculas de agua que libera oxígeno molecular. Antes de la evolución de las cianobacterias, hace unos 3 000 millones de años, la atmósfera terrestre estaba prácticamente desprovista de oxígeno y la vida sobre la tierra sólo consistía de procariotes independientes de oxígeno (anaerobios). Como se describe en el capítulo 2, el oxígeno molecular puede ser una sustancia sumamente tóxica. Conforme las cianobacterias se convirtieron en la forma dominante de vida, llenaron las aguas y la atmósfera de la tierra con el mortífero O_2 , que empujó a la mayor parte de los otros microorganismos procariotes hacia hábitat anaerobios remotos. La presencia de O_2 en la atmósfera seleccionó nuevos tipos de microorganismos que no sólo

resistieron los efectos destructivos de este gas, sino que en realidad dependían del mismo para extraer su energía química.

Muchas cianobacterias son capaces no sólo de la fotosíntesis, sino también de **fijar nitrógeno**, o sea, convertir el gas nitrógeno (N_2), de otro modo inútil, en formas reducidas de nitrógeno (como el amonio, NH_3) que las células pueden emplear para sintetizar compuestos orgánicos que contienen nitrógeno, incluyendo aminoácidos y nucleótidos. Las especies con capacidad de fotosíntesis y de fijar nitrógeno pueden sobrevivir con los recursos más simples, como luz, N_2 , CO_2 y H_2O . Por lo tanto, no es sorprendente



(b)

FIGURA 1-15. Cianobacteria. a) Micrografía electrónica de una cianobacteria que muestra la membrana citoplásmica donde se efectúa la fotosíntesis. Estos apilamientos de membranas fotosintéticas recuerdan los de las membranas tilacoides presentes dentro de cloroplastos de células vegetales, una característica que apoya la hipótesis de que los cloroplastos evolucionaron a partir de cianobacterias simbióticas. b) Las cianobacterias que viven entre los pelos de los osos polares causan el color verdoso poco habitual de su pelaje. (a: Cortesía de C.C. Remsen, S.W. Watson, J.B. Waterbury y H.S. Truper, en J. Bacteriol. 95:2374, 1968, b: cortesía de Zoological Society of Sn. Diego.)

que las cianobacterias de ordinario sean los primeros microorganismos en colonizar las rocas desnudas desprovistas de formas vivas gracias a la ardiente lava de una erupción volcánica. En la figura 1-15, *b*, se ilustra otro hábitat poco común ocupado por las cianobacterias.

Tipos de células eucariotas: especialización celular

En muchos aspectos las células más complejas no se encuentran en los grandes organismos vegetales o animales, sino más bien en algunos de los microorganismos eucariotas más pequeños, como los protozoarios ciliados que se muestran en la figura 1-16. Estas células son complejas debido a que una sola célula constituye un organismo unicelular (*de una sola célula*) completo. Todos los mecanismos necesarios para las complejas actividades en las cuales participan estos microorganismos, como percibir el ambiente, procurarse alimento, excretar el exceso de líquido, evadir a los depredadores, deben alojarse en los confines de una sola célula. La formación de microorganismos unicelulares muy complejos representa una vía de la evolución. Otra vía alterna fue la evolución de microorganismos multicelulares en los cuales las diferentes actividades son efectuadas por diferentes tipos de células especializadas. Algunas de las ventajas de la división del trabajo entre las células se puede apreciar si se examina el ciclo de vida de uno de los eucariotes más simples, el moho celular del fango, *Dictyostelium*.

Durante la mayor parte de su ciclo de vida, las células del moho del limo existen como amibas solitarias independientes que se arrastran sobre su sustrato. Cada célula es un organismo completo autosuficiente (fig. 1-17, *a*). Sin embargo, cuando el suministro de alimento escasea, aparece un nuevo tipo de actividad entre las células y se reúnen para formar un agregado llamado *seudoplasmodio*, o simplemente babosa (fig. 1-17, *b*), que se desplaza lentamente sobre el sustrato dejando un rastro de "limo o baba". Los organismos simples previamente aislados son ahora pequeñas partes de un individuo multicelular mucho mayor. El examen del interior de la babosa revela que las células ya no son una población homogénea. Más bien, las células situadas en el tercio anterior de la babosa (llamadas *células precursoras del tallo*) se pueden distinguir de las situadas en la sección posterior (llamadas *células precursoras de esporas*) mediante variados criterios (fig. 1-17, *b*, recuadro). Si se espera un poco más ocurren una serie de hechos espectaculares: el pseudoplasmodio detiene su desplazamiento, gira sobre el sustrato (fig. 1-17, *c*) y luego se extiende hacia arriba, al aire, como el cuerpo de un fruto alargado (fig. 1-17, *d*). El cuerpo de este fruto está compuesto de un delgado tallo (derivado de las células precursoras del tallo) que apoya una masa redondeada de esporas encapsuladas latentes (derivados de células precursoras de esporas). Las células del tallo y de las esporas tienen una función muy diferente que requiere diversos tipos de especialización citoplásmica. Las células del tallo suministran apoyo mecánico para sostener la masa de esporas arriba del sustrato, en tanto que las células de esporas están destinadas a "dispersarse en el viento" y transformarse en



FIGURA 1-16. *Vorticella*, un protista complejo ciliado. Cierta número de individuos se juntan; la mayoría han perdido sus "cabezas" debido al acortamiento de la banda contráctil en el tallo. (Carolina Biological Supply Co./Phototake.)

la siguiente generación de amibas. El proceso mediante el cual una célula relativamente no especializada, como el moho amibiano del fango, se convierte en una célula altamente especializada, como las células del tallo o de las esporas, se denomina **diferenciación**.

Una célula amibiana del moho del fango dispone de dos vías alternas de diferenciación cuando entra en la etapa de agregación. Por lo contrario, cuando el óvulo de un vertebrado es fertilizado y avanza en su desarrollo embrionario tiene a su disposición cientos de posibles vías de diferenciación. Algunas células se convierten en parte de una glándula digestiva particular, otras en parte de un músculo esquelético largo y otras en parte de un hueso (fig. 1-18). La vía de diferenciación que sigue cada célula embrionaria depende principalmente de las señales que recibe de su entorno, que a su vez dependen de la posición de dicha célula dentro del embrión.

Como resultado de la diferenciación, distintos tipos de células adquieren un aspecto distintivo y contienen materia-

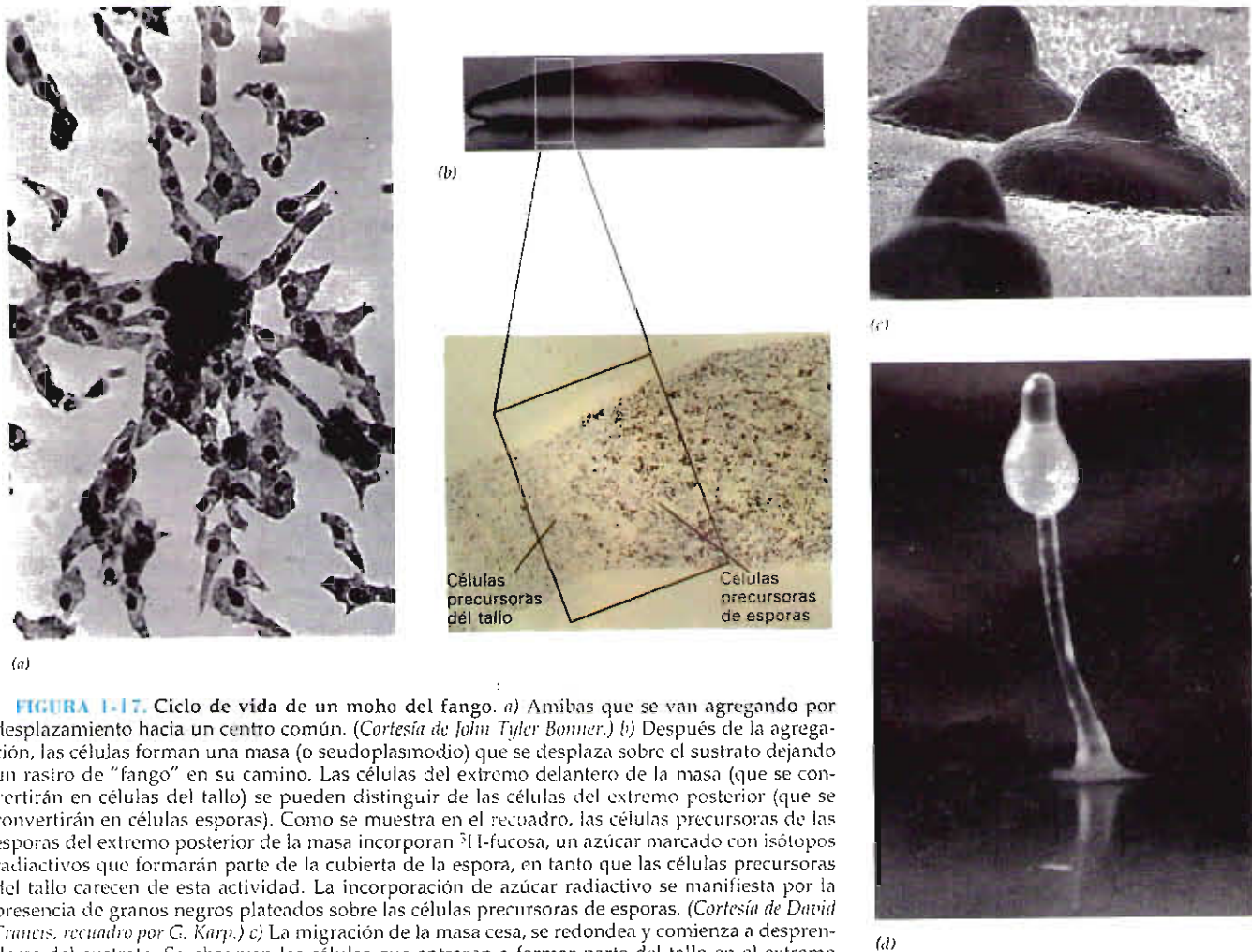


FIGURA 1-17. Ciclo de vida de un moho del fango. *a)* Amibas que se van agregando por desplazamiento hacia un centro común. (Cortesía de John Tyler Bonner.) *b)* Después de la agregación, las células forman una masa (o pseudoplasmodio) que se desplaza sobre el sustrato dejando un rastro de "fango" en su camino. Las células del extremo delantero de la masa (que se convertirán en células del tallo) se pueden distinguir de las células del extremo posterior (que se convertirán en células esporas). Como se muestra en el recuadro, las células precursoras de las esporas del extremo posterior de la masa incorporan ^{35}S I-fucosa, un azúcar marcado con isótopos radiactivos que formarán parte de la cubierta de la espora, en tanto que las células precursoras del tallo carecen de esta actividad. La incorporación de azúcar radiactivo se manifiesta por la presencia de granos negros plateados sobre las células precursoras de esporas. (Cortesía de David Francis, recuadro por C. Karp.) *c)* La migración de la masa cesa, se redondea y comienza a desprenderse del sustrato. Se observan las células que entraron a formar parte del tallo en el extremo superior. (Cortesía de Kenneth B. Raper.) *d)* El frutal consiste en un tallo alargado que sostiene una masa de esporas en su extremo superior. Cada espora dará lugar a una amiba independiente que vuelve a iniciar el ciclo de vida. (Cortesía de John Tyler Bonner.)

les únicos. Las células del músculo esquelético contienen una red de filamentos alineados con precisión y compuestos de proteínas contráctiles peculiares; las células del cartílago se rodean de una matriz característica que contiene polisacáridos y la proteína colágena, que juntos suministran apoyo mecánico; los eritrocitos se convierten en sacos de forma discoide llenos de una proteína única, la hemoglobina, que transporta oxígeno, y así sucesivamente. Sin embargo, a pesar de sus muchas diferencias, las diversas células de una planta o animal multicelular están formadas de organelos similares. Por ejemplo, se encuentran mitocondrias en prácticamente todos los tipos de células. No obstante, en un tipo pueden ser redondas en tanto que en otro a veces adoptan forma fibrilar muy alargada. De manera similar, las mitocondrias de una célula pueden estar dispersas por todo el citoplasma, en tanto que en otra las células se concentran cerca de una superficie particular donde ocurre el transporte dependiente de energía. En cada caso, el número, aspecto

y ubicación del organelo se puede correlacionar con las actividades del tipo de célula particular. Se puede establecer una analogía con las diferentes piezas que interpreta una orquesta: todas están compuestas de las mismas notas, pero los diferentes arreglos confieren a cada una sus características y bellezas únicas.

El tamaño de las células y de sus elementos

La figura 1-19 muestra comparativamente el tamaño relativo de algunas estructuras de interés en biología celular. Casi todas las células son microscópicas; por lo tanto, las unidades más comúnmente empleadas en este libro corresponden a dimensiones lineales muy pequeñas. De ordinario se emplean dos unidades de medida lineal para describir estructuras del interior de la célula: el micrómetro (μm) y el nanómetro (nm). Un μm es igual a 10^{-6} metros y un nm

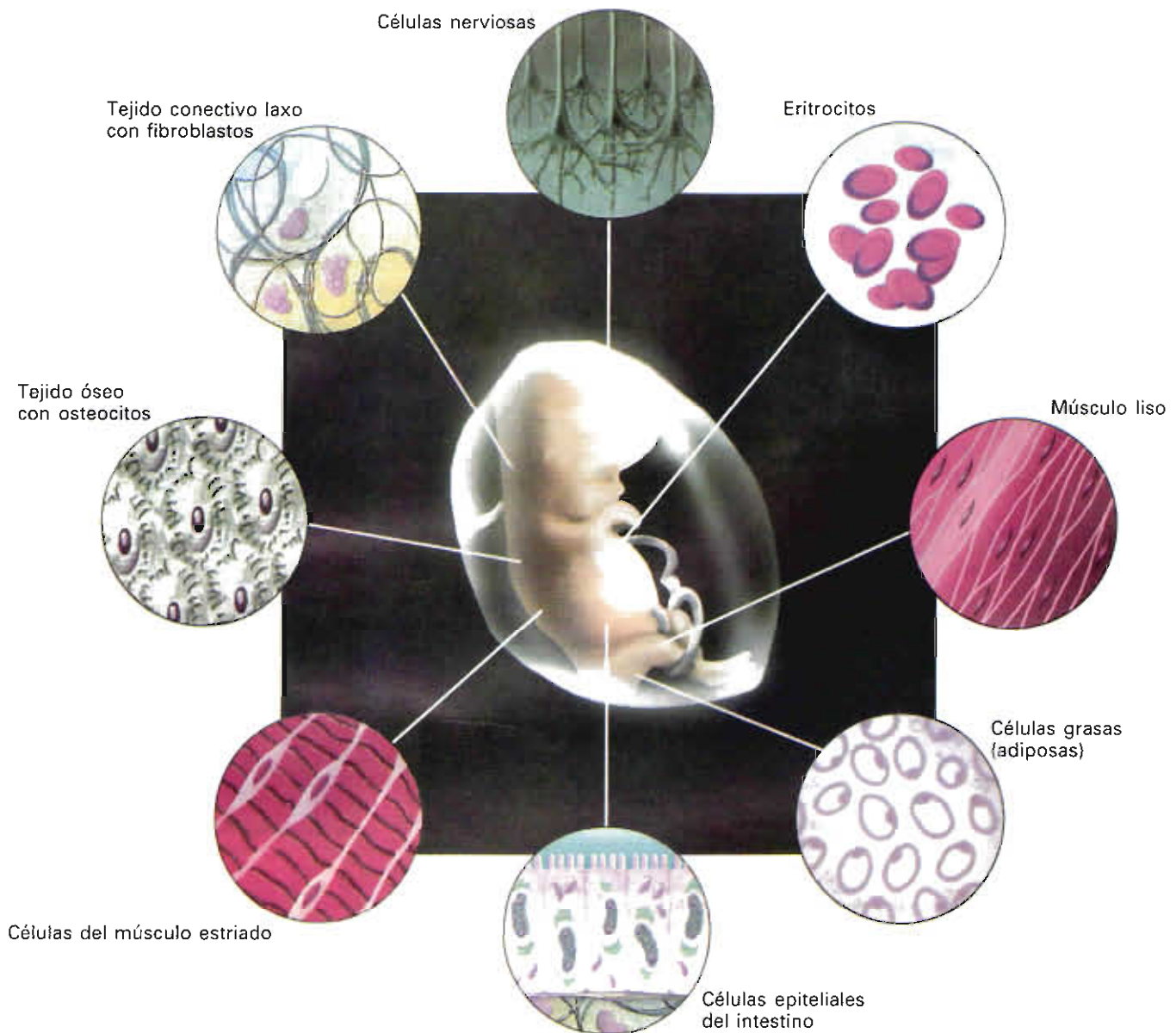


FIGURA 1-18. Vías de diferenciación celular. Se presentan unos pocos de los tipos de diferenciación celular en el feto humano.

es igual a 10^{-9} metros. Aunque ya no se acepta formalmente en la nomenclatura métrica, el angstrom (Å), que es igual a un décimo de nm, todavía se emplea con frecuencia en biología molecular para describir dimensiones atómicas. Un angstrom por lo general equivale al diámetro de un átomo de hidrógeno. Una molécula proteínica globular típica (como la mioglobina) tiene $4.5 \text{ nm} \times 3.5 \text{ nm} \times 2.5 \text{ nm}$ y las proteínas alargadas (como la colágena o la miosina) tienen más de 100 nm de longitud, y el DNA tiene más o menos 2.0 nm de ancho. Complejos de moléculas grandes, como los ribosomas, microtúbulos y microfilamentos, poseen diámetro entre 5 y 25 nm. Organelos más grandes, como los núcleos (unos $10 \mu\text{m}$) o las mitocondrias (alrededor de $2 \mu\text{m}$) son más fáciles de definir en micrómetros.

El tamaño de las bacterias típicas varía entre 1 y $5 \mu\text{m}$ de longitud, en tanto que las células eucariotas de ordinario tienen entre 10 y $30 \mu\text{m}$. Hay bastantes razones para que las células sean tan pequeñas. Consideremos las siguientes:

- Independientemente del tamaño de la célula, el núcleo único sólo contiene dos copias de la mayor parte de los genes. Puesto que los genes actúan como moldes para la producción de RNA mensajeros transportadores de información, una célula sólo puede producir un número limitado de RNA mensajeros en determinado tiempo. Cuanto mayor sea el volumen del citoplasma celular más difícil será sintetizar el número requerido de mensajes nucleares.

- Conforme el tamaño de la célula se incrementa, la proporción entre superficie/volumen disminuye.¹ La capacidad de una célula para intercambiar sustancias en su ambiente es proporcional a la superficie. Si una célula crece más de cierto tamaño, su superficie no sería suficiente para captar sustancias (p. ej., oxígeno, nutrientes) necesarios para apoyar sus actividades metabólicas.
- Una célula depende en gran medida del movimiento al azar de las moléculas (*difusión*). Por ejemplo, el oxígeno debe difundir desde la superficie de la célula a través del citoplasma hasta el interior de las mitocondrias. Conforme la célula aumenta de tamaño y la distancia de la superficie al interior también crece, el tiempo

requerido para que la difusión desplace las sustancias hacia adentro y hacia afuera de la célula metabólicamente activa puede ser prohibitivamente prolongado.

Las células que tienen dimensiones excepcionalmente grandes, como el huevo de avestruz y la célula nerviosa de la jirafa, en la figura 1-19, tienen propiedades poco habituales. El huevo del avestruz, y los huevos de muchos otros peces, reptiles y aves, en realidad contienen una cantidad muy pequeña de protoplasma vivo que se sitúa por encima de una gran cantidad de yema inerte, empleada como nutriente para el embrión en desarrollo. Aunque la célula nerviosa de la jirafa y las células nerviosas de otros animales grandes pueden ser muy largas, su diámetro todavía es microscópicamente pequeño.

¹ Se puede comprobar esta afirmación calculando área y volumen de un cubo cuyas aristas sean de 1 cm de longitud en comparación con otro cuyas aristas sean de 10 cm de longitud. La proporción área/volumen del cubo más pequeño es considerablemente mayor que la del cubo más grande.

1-4 Virus

En los últimos decenios del siglo XIX, el trabajo de Louis Pasteur y de otros investigadores convenció al mundo científico de que las enfermedades infecciosas de plantas y ani-

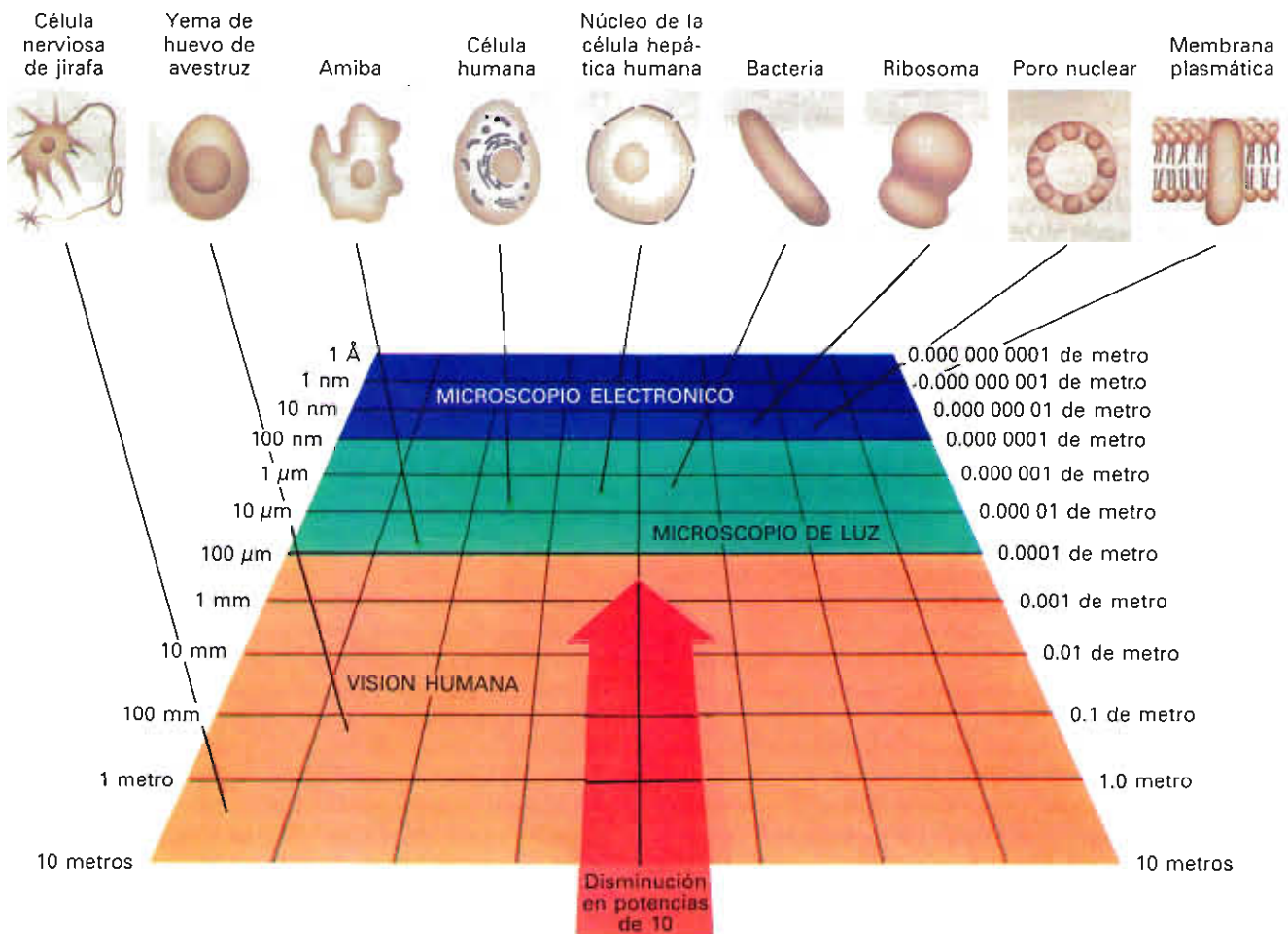


FIGURA 1-19. Tamaños relativos de las células y de los componentes celulares. Cada unidad de medida es un décimo mayor que la unidad precedente. Aunque el huevo completo de avestruz es técnicamente una célula, la porción viva sólo se encuentra como un delgado disco microscópico situado sobre el borde de una gran masa inerte de yema de huevo.

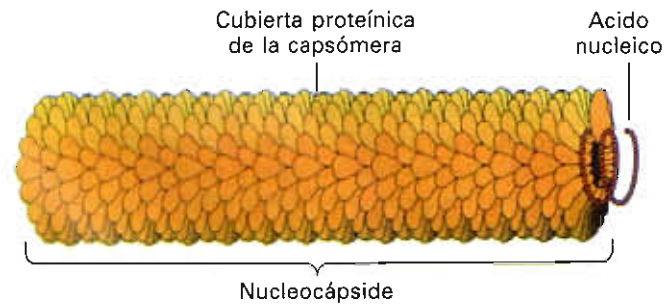
males eran causadas por bacterias. Pero el estudio de la enfermedad del mosaico del tabaco y la fiebre aftosa del ganado pronto indicaron la existencia de otro tipo de agentes infecciosos. Por ejemplo, se observó que la savia de una planta de tabaco enferma era capaz de transmitir la enfermedad del mosaico a una planta saludable, aun cuando la savia no demostró contener bacterias cuando se examinó al microscopio de luz. Además, la savia de una planta continuaba siendo infecciosa aun después de pasar a través de filtros cuyos poros eran tan pequeños que retardaban el paso de las bacterias más pequeñas conocidas. Estudios adicionales demostraron que, a diferencia de las bacterias, el agente infeccioso no podía crecer en medios de cultivo a menos que también estuvieran presentes células vegetales vivas. Los investigadores concluyeron que ciertas enfermedades eran causadas por patógenos aún más pequeños y quizá más simples que las bacterias más pequeñas. Estos patógenos recibieron el nombre de **virus**.

En 1935, Wendell Stanley, del Instituto Rockefeller, publicó que el virus causante de la enfermedad del mosaico del tabaco se podía cristalizar y que los cristales eran infecciosos. Los cristales poseen una estructura interna regularmente repetitiva. Las sustancias que forman cristales tienen una estructura bien definida muy ordenada y son mucho menos complejas que las células más simples. Stanley concluyó erróneamente que el virus del mosaico del tabaco (VMT) era una proteína. En realidad, el VMT es una partícula en forma de bastoncillo que consta de una sola molécula de RNA rodeada por una cubierta helicoidal compuesta de subunidades de proteína (fig. 1-20).

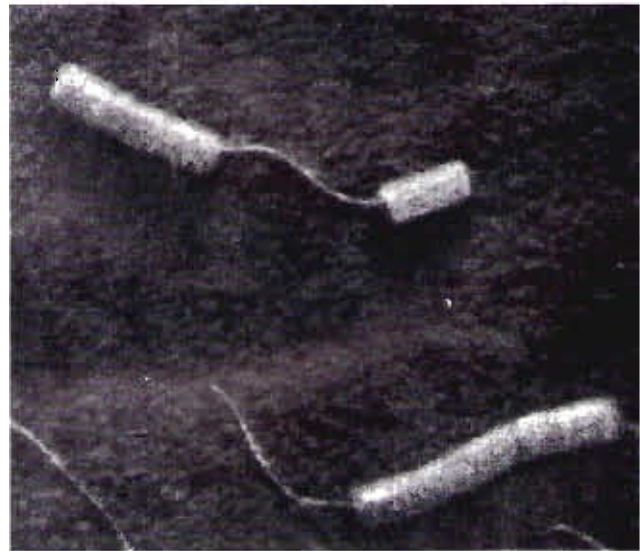
Los virus causan docenas de enfermedades en el ser humano, incluyendo SIDA, poliomielitis, influenza, herpes labial, sarampión y unos pocos tipos de cáncer (véase sección 16-3). Los virus presentan una gran variedad de formas, tamaños y estructuras muy diferentes, pero todos comparten ciertas propiedades comunes. Todos los virus son parásitos intracelulares obligatorios, o sea, no pueden reproducirse a menos que se encuentren dentro de una célula huésped, la cual, según el virus específico, puede ser una célula vegetal, animal o bacteriana. Fuera de una célula viva, el virus existe como partícula, o **virión**, que no es más que un paquete de macromoléculas. El virión contiene una pequeña cantidad de material genético que, según el virus, puede ser RNA o DNA de cadena simple o doble. Es notable que algunos virus contienen escasos genes diferentes, tres o cuatro, pero otros pueden tener hasta varios cientos de ellos. Cuanto menor el número de genes más depende el virus de las enzimas y de otras proteínas codificadas por los genes de su célula huésped.

El material genético del virión está rodeado por una cápsula proteínica, o **cápside**, por lo general constituida por un número específico de subunidades. Entre las ventajas de construir con subunidades una de las más aparentes es economizar información genética. Si la cubierta del virus está formada por muchas copias de una sola proteína, como en el VMT, o de unas pocas proteínas como las cubiertas de muchos otros virus, sólo se necesita uno o unos cuantos genes para codificar las proteínas de la cubierta.

Muchos virus poseen una cápside cuyas subunidades se organizan en formas poliédricas, una estructura con la-



(a)



(b)

50 nm

FIGURA 1-20. Virus del mosaico del tabaco (VMT). *a)* Diagrama de una porción de la partícula del VMT. Las subunidades de proteína en forma de bastón (capsómero) que son idénticas en toda la longitud de la partícula incluyen una sola molécula helicoidal de RNA. Se muestra el RNA que sobresale en el extremo donde se ha desprendido la proteína. La cápside proteínica con el RNA incluido se denomina *nucleocápside*. *b)* Micrografía electrónica de partículas del VMT luego de tratamiento con fenol para eliminar las subunidades de proteína de la porción media de la partícula de arriba y de los extremos de la partícula de abajo. Los bastones íntegros tienen unos 300 nm de longitud y 18 nm de diámetro. (*b*: Cortesía de M.K. Corbett.)

dos planos. Una forma poliédrica particularmente común en los virus es el **icosaedro** de 20 caras. Por ejemplo, el adenovirus que provoca infecciones respiratorias en mamíferos tiene una cápside icosaédrica (fig. 1-21, *a*). En muchos virus de animales, incluyendo el *virus de la inmunodeficiencia humana* (HIV) causante del SIDA, la cápside proteínica está rodeada por una **cubierta** externa que contiene lípidos derivados de la membrana plasmática de la célula huésped conforme las yemas virales se forman en la superficie de la célula huésped (fig. 1-21, *b*). Integrada a la cubierta lipídica se encuentran las proteínas virales localizadas en la membrana plasmática de la célula huésped antes de la gemación. Los virus de bacterias, o *bacteriófagos*, son de los más complejos (fig. 1-21, *c*). El bacteriófago T (utilizado en experimentos clave que revelaron la estructura y propiedades del mate-

rial genético) consta de una cabeza poliédrica que contiene DNA, un tallo cilíndrico a través del cual se inyecta DNA al interior de la célula bacteriana, y una cola de fibras que juntas dan a la partícula el aspecto de un módulo que aterri-za sobre la luna.

Cada virus tiene sobre su superficie una proteína capaz de enlazarse a un componente particular de la superficie de su célula huésped. Por ejemplo, la proteína que se proyecta desde la superficie de la partícula del HIV (marcada gp120 en la figura 1-21, *b*, recibe ese nombre por glucoproteína con peso molecular de 120 000 daltons²) interactúa con una proteína sobre la superficie del leucocito humano, lo que facilita la entrada del virus al interior de su célula huésped. Como se analiza en el ensayo *La perspectiva humana*, la partícula gp120 es la base de la primera generación de vacunas anti SIDA que en la actualidad están en prueba.

La interacción entre las proteínas virales y las del huésped determina la especificidad del virus, o sea, el tipo de células huésped a las cuales el virus puede penetrar e infec-

tar. Algunos virus tienen un conjunto muy limitado de posibles huéspedes, sólo tienen capacidad para infectar algunas células de ciertos huéspedes. Esto es cierto, por ejemplo, para la mayor parte de los virus del resfriado común que sólo pueden infectar células epiteliales respiratorias del ser humano. Otros virus, como el de la rabia, pueden infectar a una variedad de diferentes especies de huéspedes, incluyendo perros, murciélagos y el hombre.

Los viriones son agregados macromoleculares, partículas inanimadas que por sí mismas son incapaces de reproducirse, efectuar actividades metabólicas o cualquiera otra actividad relacionada con la vida. Por esta razón, no se considera organismos a los virus y no se describen como “seres vivos”. No obstante, una vez que se fijan a la superficie externa de un huésped y pasan al interior de la membrana externa de la célula el virus contiene la información necesaria para alterar totalmente las actividades de la célula huésped. Hay dos tipos básicos de infección viral: 1) En la mayor parte de los casos el virus detiene las actividades normales de síntesis en el huésped y reorienta a la célula para emplear sus materiales disponibles en la elaboración de ácidos nucleicos y proteínas virales, que se ensamblan para formar nuevos viriones. En otras palabras, los virus no crecen como

² El Dalton equivale a una unidad de masa atómica, el peso de un solo átomo de hidrógeno (¹H).

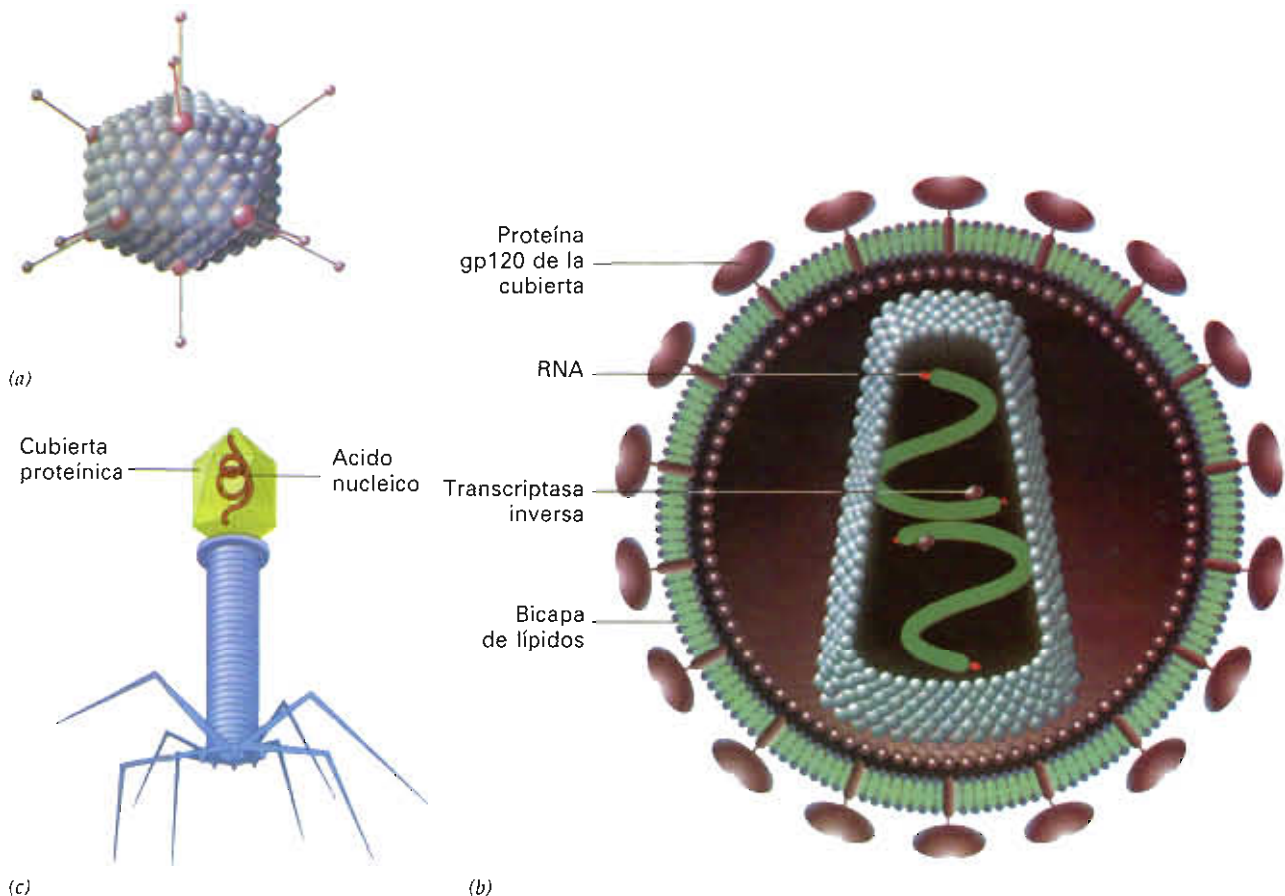
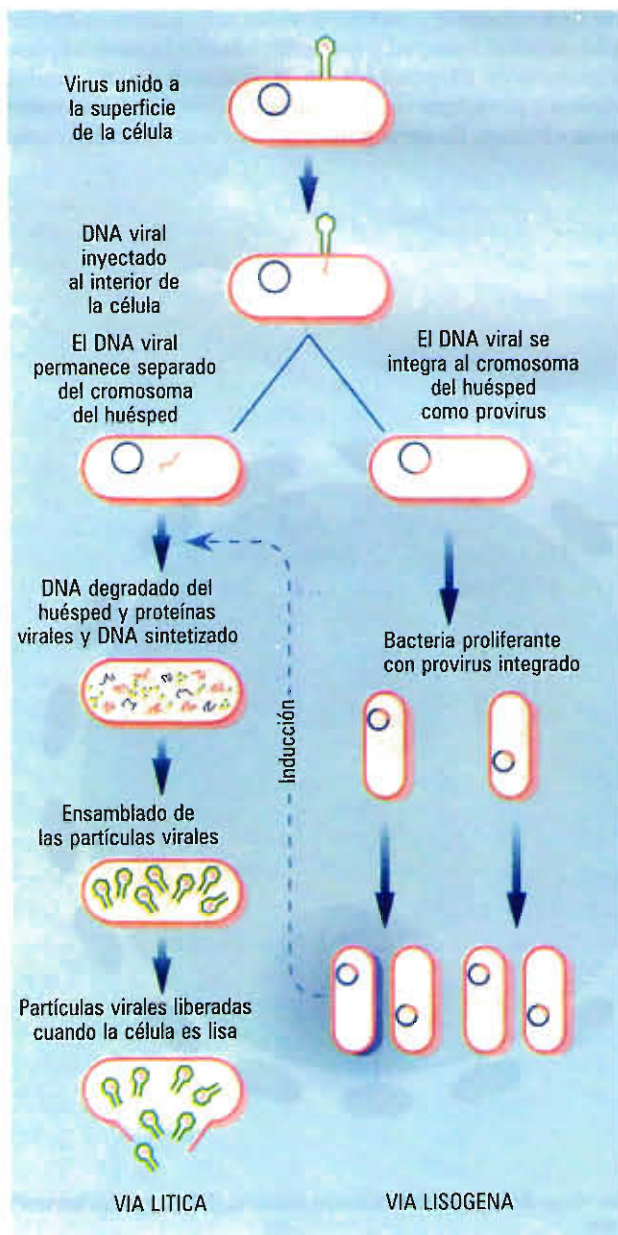


FIGURA 1-21. Diversidad de los virus. Estructuras de: *a*) un adenovirus, *b*) un virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), y *c*) un bacteriófago T-homógeno.

células; se ensamblan directamente a partir de sus elementos para formar viriones de tamaño maduro. Por último, la célula infectada se rompe (*lisis*) y libera una nueva generación de partículas virales capaces de infectar a las células vecinas. Un ejemplo de este tipo de infección *lítica* se muestra en el recuadro a la izquierda de la figura 1-22, *a*, y en la fotografía de la figura 1-22, *b*. 2) En otros casos, el virus infectante no provoca la muerte de la célula huésped, sino en vez de ello introduce (*integra*) su DNA al DNA de los cromosomas de la célula huésped. El DNA viral integrado se denomina **provirus**. Un provirus integrado puede tener varios tipos de efectos según el tipo de virus y de célula huésped. Por ejemplo:

- Las células bacterianas que contienen un provirus se comportan normalmente en tanto no se expongan a algún tipo de estímulo, como la radiación ultravioleta (UV) que activa al DNA viral “latente”, lo que provoca la lisis celular y libera a la progenie viral. El virus lambda es un virus bacteriano capaz de integrar su DNA a los cromosomas de la célula del huésped, como se indica en la figura 1-22, *a*, recuadro a la derecha.
- Algunas células animales que contienen un provirus producen una nueva progenie viral por gemación en la superficie de la célula sin lisis de la célula infectada. El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) actúa de esta manera; una célula infectada puede permanecer



(a)

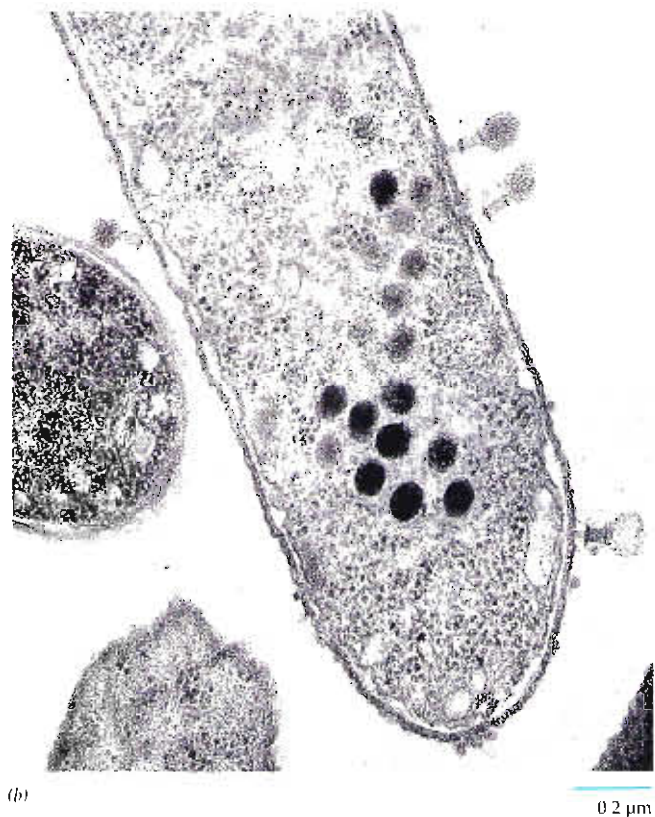


FIGURA 1-22. Infección con un virus. *a*) Cuando el virus bacteriano (bacteriófago) lambda inyecta su DNA en una célula huésped el resultado puede ser una de dos tipos de infección. La mayor parte de los agentes infecciosos siguen una *vía lítica* ilustrada en el recuadro izquierdo, donde la célula bacteriana sirve como máquina para producir la progenie viral que se libera después que la célula sufre lisis. En otros casos, el virus entra a una llamada *vía lisógena* (recuadro derecho) en la cual el DNA del virus se integra a los cromosomas de la célula del huésped como un provirus reprimido. El provirus latente puede ser inducido a iniciar una infección lítica por diferentes tipos de estímulo, incluyendo radiación por luz UV (indicado por la célula de color más claro a la izquierda). *b*) Una última etapa de la infección de una célula bacteriana por un bacteriófago, que muestra la acumulación ordenada de numerosas partículas virales y la cubierta vacía del fago sobre la superficie celular. (*b*: Cortesía de Jonathan King y Erika Hartwig.)

viva mientras actúe como fábrica para producir nuevos viriones.

- Algunas células animales que contiene un provirus pierden el control de su propio crecimiento y división y se convierten en malignas. Este fenómeno se puede estudiar con facilidad en el laboratorio al infectar células cultivadas con el virus tumoral apropiado.

Debido a su estructura sencilla, se podría concluir que los virus representan una forma primitiva de vida, tal vez similar a las que existieron sobre la tierra antes de la evolución de las células procariotas. Sin embargo, cuando se considera que la "vida de los virus" depende por completo de las células que invade, es evidente que los virus no pudieron aparecer en el escenario antes que sus huéspedes. Puesto que los virus comparten el mismo lenguaje genético entre sí y también con células procariotas y eucariotas, no pudieron originarse de manera independiente como forma primitiva *después* que otras células habían evolucionado. Es más razonable asumir que los virus representan una forma degenerada, o sea, derivada de un organismo más complejo. Los virus al parecer evolucionaron a partir de pequeños fragmentos de cromosomas celulares capaces de mantener algún tipo de existencia autónoma dentro de las células. Con el tiempo, estos elementos genéticos autónomos adquirieron una cubierta proteínica y se convirtieron en agentes capaces de infectar a otras células. Considerando la tremenda diversidad de los virus es probable que diferentes grupos evolucionaran de manera independiente a partir de diferentes organismos celulares. Esta conclusión se corrobora por el hecho de que los genes presentes en cada grupo de virus son muy diferentes de los correspondientes a otros grupos, pero son similares a los genes que infectan dentro de la célula huésped. El hecho de que los virus humanos utilicen las enzimas del huésped para efectuar casi todas sus actividades metabólicas hace muy difícil encontrar fármacos que impidan los pasos del ciclo viral sin dañar al huésped humano.

Los virus no carecen de virtudes; puesto que la actividad de los genes virales imita a la de los genes del huésped, los investigadores han utilizado por decenios a los virus

como herramientas para estudiar el mecanismo de duplicación del DNA y la expresión de los genes en huéspedes mucho más complejos. Además, en la actualidad los virus se emplean como medio para introducir genes extraños a las células humanas, técnica que será la base para el tratamiento de enfermedades humanas mediante genoterapia. Por último, los virus que matan insectos en el futuro podrán desempeñar un papel cada vez mayor en la guerra contra plagas de insectos.

Viroides

En 1971, sorpresivamente se descubrió que los virus no eran los tipos más simples de agentes infecciosos. En aquel año, T.O. Diener, del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, comunicó que la enfermedad por adelgazamiento de los tubérculos de la patata que produce patatas nudosas y agrietadas era causada por un agente infeccioso que consistía en una molécula circular pequeña de RNA desprovista totalmente de cubierta proteínica. Diener denominó a este patógeno un **viroide**. El tamaño del RNA de los viroides oscila entre 240 y 600 nucleótidos aproximadamente, la décima parte del tamaño de los virus más pequeños. No se ha demostrado que el RNA viroide desnudo codifique para alguna proteína. Más bien, cualquier actividad bioquímica en la cual participan los viroides se efectúa utilizando proteínas de la célula huésped. Por ejemplo, para duplicarse dentro de una célula infectada el RNA viroide utiliza el RNA polimerasa II del huésped, una enzima que normalmente transcribe el DNA del huésped en RNA mensajero. Se cree que los viroides provocan enfermedades al intervenir en la vía normal de expresión genética de las células. Los efectos sobre las cosechas pueden ser graves; una enfermedad viroide llamada *cadang-cadang* devastó las palmeras cocoteras en plantaciones de las Islas Filipinas y otro viroide provocó grandes estragos a la industria de los crisantemos en Estados Unidos. En el ensayo *La vía experimental* se relata el descubrimiento de un tipo diferente de agente infeccioso aun más simple que el viroide.

LA PERSPECTIVA HUMANA

La búsqueda de una vacuna contra el SIDA

A la mitad del decenio de 1980 había grandes esperanzas de desarrollar una vacuna para prevenir la infección con HIV, el virus causante del SIDA. La mayor parte de las vacunas contra enfermedades virales, como la poliomielitis, la viruela negra y el sarampión, contienen virus muertos íntegros o virus vivos atenuados (virus modificados que ya no son capaces de provocar infección grave). La inyección de estos virus inofensivos engaña al sistema inmunológico del cuerpo para producir anticuerpos específicos y células de inmunidad que permanecen a la espera, listas para atacar al auténtico virus causante de la enfermedad si logra penetrar al organismo. Una de las ventajas de utilizar virus vivos atenuados como parte de una vacuna es que se estimula a las vías humoral y celular del sistema inmunológico. La inmunidad humoral es mediada por anticuerpos solubles disueltos en la sangre. Estos anticuerpos son sintetizados por células derivadas de linfocitos B. Por lo contrario, los linfocitos T se encargan de la inmunidad mediada por células, células capaces de reconocer y destruir a las células del cuerpo infectadas por virus.

Durante el decenio de 1980, prácticamente había acuerdo unánime de que una vacuna contra el SIDA, dependiente de virus muertos o atenuados, era segura. A diferencia de la mayor parte de los virus infecciosos, el HIV integra su material genético a los cromosomas del huésped, donde permanece durante años destruyendo gradualmente la salud de una persona. Toda vacuna contra el SIDA que contenga partículas virales también contiene RNA viral, el cual puede copiarse a DNA e integrarse a los cromosomas celulares. Aun si pudiera alterarse el material genético del virus

de modo que no tuviera posibilidad de causar SIDA, tal vacuna aún podría ser peligrosa porque la integración de cualquier material genético al DNA de una célula tiene el riesgo de convertirla en una célula cancerosa maligna.

Había acuerdo de que el camino más seguro era desarrollar una vacuna a partir de la proteína del virus proyectada hacia afuera de la cubierta viral. Esta proteína de la cubierta, denominada gp120 (fig. 1-21, b) es el componente de la partícula viral que se enlaza a la superficie externa de la célula huésped antes de infectarla. La proteína viral empleada para la vacuna tendría que elaborarse a partir de un gen sintetizado en el laboratorio. El gen se introduciría a células de mamíferos que pueden desarrollarse en gran cantidad en el laboratorio. Las células sometidas a procesos de ingeniería genética producirían una gran cantidad de la proteína que debía purificarse y emplearse para fabricar la vacuna. Se esperaba que la vacuna constituida por la proteína de la cubierta del HIV obligara a la persona a sintetizar anticuerpos *neutralizantes*, o sea anticuerpos capaces de bloquear la entrada del virus a la célula y por lo tanto de prevenir que las personas expuestas al virus se infectaran. Una desventaja de la vacuna basada sólo en la proteína de la cubierta es que no se esperaba que estimulara la vía del sistema inmunológico mediada por células, la cual tal vez se necesitaba para destruir una célula que fuera infectada por el virus.

Numerosas compañías en colaboración con varias agencias gubernamentales alrededor del mundo produjeron vacunas a base de proteínas de la cubierta del HIV. Las primeras dos fases de prueba clínica de una nueva vacuna están diseñadas para determinar si la vacuna es segura y capaz de

inducir una respuesta inmunológica. Aunque todas las vacunas parecieron seguras por no producir efectos colaterales aparentes en los individuos sometidos a la prueba, su éxito para producir una respuesta de inmunidad fue variable. Por último, se determinó que las vacunas elaboradas por dos compañías, Genentech y Chiron/Ciba-Geigy, inducen un nivel aceptable de anticuerpos en individuos vacunados durante un periodo razonable. De igual importancia, se demostró que estos anticuerpos *in vitro* evitan que el virus infecte células. Se programaron estudios en gran escala para iniciarlos en 1994 para probar la *eficacia* de la vacuna, esto es, si era capaz de prevenir la infección con HIV en miembros de poblaciones de alto riesgo. Pero hubo una serie de acontecimientos que cambiaron los planes.

Se descubrió que los anticuerpos producidos por las personas en respuesta a la vacuna no eran tan eficaces como se pensó para prevenir la infección. Se habían llevado a cabo pruebas anteriores de actividad neutralizante empleando virus desarrollados en el laboratorio en líneas de células cultivadas. Cuando se probaron anticuerpos contra el virus aislados de personas infectadas con HIV mostraron ineficacia casi total para prevenir la infección de las células. A diferencia de casi todos los virus, el HIV puede mutar con rapidez y provocar cambios en la estructura de su cubierta proteínica. Por lo tanto, los anticuerpos aparentemente fueron producidos contra una versión de la cubierta proteínica presente en los virus de las células cultivadas, pero no del virus residente en la mayoría de los individuos infectados. Este resultado produjo gran pesimismo en muchos investigadores respecto de que la vacuna fuera eficaz para prevenir la infec-

ción por HIV en la población general. Además, era realmente difícil conseguir voluntarios para el estudio. No sólo a un número significativo de voluntarios se les administraría vacuna placebo, y los que recibieran la verdadera vacuna en adelante tendrían que ser positivos al HIV, debido a que la prueba para determinar el estado HIV depende de la presencia de anticuerpos para los cuales se diseñó la vacuna. Para empeorar las cosas, hubo informes de que al menos 10 individuos que habían participado en los primeros estudios diseñados para determinar la seguridad y potencia inmunológicas de la vacuna se habían infectado con el virus. Estas noticias confirmaron la idea cada vez más extendida de que la vacuna no era lo suficientemente eficaz para justificar un estudio en gran escala en Estados Unidos. Por último, se observó que normalmente un individuo infectado produce anticuerpos contra las proteínas de la cubierta viral después de unos cuantos meses de la infección, pero al parecer tienen poco valor para alterar el curso de la enfermedad.

En junio de 1994, luego de considerar todos estos factores en conjunto, los National Institutes of Health tomaron la decisión de no seguir adelante con las pruebas en gran escala para probar la eficacia de vacunas basadas en gp120 en Estados Unidos. Poco después de esta decisión, la Organización Mundial de la Salud (OMS) decidió proseguir las pruebas en una región del mundo donde el riesgo de contraer SIDA es muy alto. Se estimó que para el año 2000 unos 40 millones de personas estarán infectadas con el HIV; más de 90% de esos individuos vivirán en países pobres del tercer mundo. La vacuna ya lista para probar se preparó contra proteínas de la cubierta de la cepa B del HIV prevaleciente en Estados Unidos y Europa, pero no en el resto del mundo donde predominan otras cepas. Por lo tanto, los estudios de la OMS tendrán que esperar el desarrollo de una nueva vacuna basada en proteínas de las cepas del HIV en-

démicas en la región del mundo donde se efectuarán las pruebas.

Mientras tanto, los inconvenientes que acompañan a la primera generación de vacunas HIV, además de la creencia general de que la biología de la enfermedad es demasiado compleja para dismantelarla mediante una simple vacuna, llevaron a muchos investigadores del SIDA a reconsiderar la posibilidad de desarrollar una vacuna basada en virus vivo atenuado. Como se hizo notar antes, una de las ventajas de emplear virus atenuado es estimular ambas vías del sistema inmunológico: la humoral y la mediada por células incrementando, por lo tanto, su probable eficacia. Aunque esta vacuna presenta una posibilidad finita de inducir cáncer o de causar SIDA, ese riesgo está bastante bien equilibrado en una población con probabilidad elevada de contraer la enfermedad. En la actualidad, varias compañías de biotecnología están trabajando sobre vacunas elaboradas con virus atenuados que muestran eficacia para prevenir la enfermedad en animales de laboratorio. Otro método para inducir inmunidad es introducir el gen de la proteína de la cubierta del HIV en el DNA de otro virus, por ejemplo el virus de la vacuna, y emplear el virus vivo así manipulado como agente inmunizante. Por ejemplo, el virus de la vacuna manipulado causaría una infección leve y estimularía al cuerpo a producir anticuerpos y células inmunes contra la proteína HIV generada durante la infección con el virus de la vacuna.

Los investigadores del SIDA se muestran muy pesimistas acerca de la probabilidad de desarrollar una vacuna eficaz en el futuro cercano. Hay muchas razones para ese pesimismo, pero lo más importante es que los investigadores todavía no comprenden por completo cómo opera el virus dentro del cuerpo o por qué razón la respuesta inmunológica normal es tan ineficaz contra la infección. Otra complicación se origina en la capacidad del virus para mutar con demasiada rapi-

dez, incluso mientras se está propagando dentro de un individuo infectado. Como resultado, un individuo infectado porta múltiples variantes del virus, cada una con diferentes propiedades. Estas diferencias se amplían cuando se examina la estructura del virus en los diferentes miembros de una población (fig. PH 1-1). Puesto que una vacuna eficaz contra una cepa de virus puede ser totalmente inútil contra otra cepa, el problema de desarrollar una cepa de virus para elaborar una vacuna eficaz contra todos es muy complicado.

Otra forma alternativa para la prevención y tratamiento del SIDA se analizará en *La perspectiva humana* del capítulo 11.

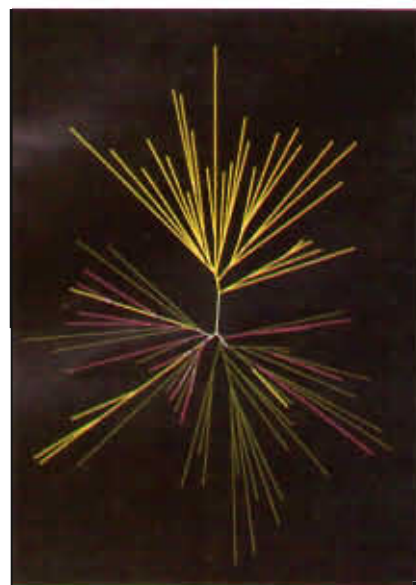


FIGURA PH 1-1. Árbol filogenético del HIV. Las tres ramas de este árbol reflejan las diferencias en la estructura de las proteínas del HIV en tres diferentes grupos de individuos infectados que viven en Amsterdam; éstos son: adictos a drogas intravenosas (amarillo), homosexuales masculinos (verde) y hemofílicos (púrpura). Las diferentes ramificaciones dentro de cada color ilustran el grado de variación viral dentro de estas subpoblaciones holandesas. Para que una vacuna basada en proteínas virales pueda ser útil contra el HIV tiene que estar dirigida contra partes de la proteína con el menor grado de variabilidad dentro de la población. (Cortesía de Jaap Goudsmit.)

LA VIA EXPERIMENTAL

Priones: solución de un enigma médico

En 1957, Carleton Gajdusek trabajaba como científico visitante en Australia estudiando genética viral e inmunología. Su interés en los problemas médicos de las culturas nativas lo había llevado a las cercanías de Nueva Guinea para lo que él esperaba sería una visita breve antes de regresar a casa en Estados Unidos. Un par de días después de su llegada a Nueva Guinea, Gajdusek habló con Vincent Zigas, médico local, quien le habló acerca de una misteriosa enfermedad que causaba más de la mitad de las muertes entre los pobladores de unas remotas montañas de la isla. Los nativos llamaban a la enfermedad kuru, que significaba “sacudidas o temblores”, debido a que en las primeras etapas las víctimas presentaban temblores involuntarios. En los siguientes meses, las víctimas (principalmente mujeres y niños) evolucionaban pasando por etapas de debilidad creciente, demencia y parálisis, que finalmente les arrancaba la existencia. Gajdusek decidió abandonar sus planes de viaje y permanecer en Nueva Guinea para estudiar la enfermedad.

Al escuchar los síntomas de la enfermedad, Gajdusek concluyó que las personas de la región probablemente sufrían encefalitis viral epidémica. La enfermedad tal vez se propagaba entre la población por la práctica ritual de comer ciertas partes del cuerpo de los parientes muertos. Como en las aldeas las mujeres eran quienes preparaban los cuerpos, tenían oportunidad de participar en esta forma de canibalismo y serían ellas las que estuvieran en mayor peligro de contraer la infección. En los meses subsiguientes, Gajdusek ayudó a cuidar a los aldeanos enfermos en un hospital improvisado, efectuó autopsias de los pacientes muertos y preparó muestras de tejidos y de líquidos para enviar a los laboratorios de Australia. En una de sus primeras cartas al exterior, Gajdusek escribió: “Tuvimos un paciente muerto de kuru y efectuamos autopsia completa. La practiqué a las 2:00 a.m. bajo el rugido de una tempestad en una choza nativa con la luz de una linterna; seccioné el cerebro sin bisturí.”¹ Los cortes del cerebro revelaron que las víctimas de kuru morían como resultado de un extenso proceso degenerativo en el cerebro.

Se comenzaron a acumular pruebas de que el kuru no era una infección viral. Los pacientes muertos de Kuru no mostraban ninguno de los síntomas que normalmente acompañan a las infecciones del sistema nervioso central, como fiebre, inflamación encefálica y cambios en la composición del líquido cefalorraquídeo. Además, los mejores laboratorios de virología de Australia no pudieron cultivar agente infeccioso alguno en las muestras de tejido enfermo. Gajdusek empezó a considerar explicaciones alternativas como causa del kuru. Había la posibilidad de que los aldeanos muertos se hubieran expuesto a algún tipo de sustancia tóxica en su dieta. Se efectuaron análisis de sangre con la esperanza de hallar concentraciones elevadas de metales, grasas o de otras toxinas comunes, pero no se encontró anomalía clínica alguna.

En este punto, Gajdusek pensó que el kuru podía ser una enfermedad hereditaria, pero a partir de comentarios con los genetistas concluyó que era muy improbable. Por ejemplo, para una enfermedad hereditaria sería prácticamente imposible lo siguiente: 1) una mortalidad tan elevada de origen al parecer reciente y que alcanzara una frecuencia tan alta en la población; 2) que se manifestara en individuos de grupos de edad tan diversa, desde niños de corta edad hasta adultos de edad avanzada; 3) que afectara en igual número a hombres y a mujeres jóvenes, pero que atacara a mujeres adultas en proporción 13 veces mayor que a los hombres; 4) que ocurriera en una persona nacida en otra región de la isla que se había mudado a vivir a la población afectada.

No parecía haber una explicación razonable de la causa del kuru. Gajdusek incluso consideró la posibilidad de que el kuru era una enfermedad mental. “Puesto que en la etapa temprana de la enfermedad muchas cosas sugieren histeria..., no puedo desechar de mi mente la idea de la psicosis. Pero el parkinsonismo típico avanzado y los trastornos de los ganglios basales que por último producen la muerte no se pueden vincular fácilmente con psicosis, a pesar del papel que esta enfermedad desempeña en la brujería, los asesinatos, las guerras locales, etc.”

William Hadlow, veterinario patólogo estadounidense, había trabajado sobre una enfermedad neurológica degenerativa llamada “scrapie” (encefalitis espongiforme), común en ovejas y cabras. En 1959, Hadlow visitó una exposición en Londres, auspiciada por una compañía farmacéutica británica, donde vio muestras de neuropatología preparadas por Carleton Gajdusek de una persona muerta de kuru. Hadlow quedó impresionado por el notable parecido entre las anomalías del cerebro de las víctimas de kuru y las observadas en cerebros de ovejas muertas por encefalitis espongiforme. Se sabía que la encefalitis espongiforme era causada por un agente infeccioso; esto se había demostrado por transmisión de la enfermedad a ovejas saludables inyectándoles extractos preparados de animales muertos. El agente causante del “scrapie” era capaz de atravesar filtros que retardaban el paso de bacterias y por esa razón se asumió que se trataba de un virus. Sin embargo, a diferencia de otras enfermedades virales, los síntomas del “scrapie” no aparecían sino después de meses que el animal se había infectado con el patógeno, por lo que se le dio el nombre de “virus lento”. Hadlow concluyó que el kuru y la encefalitis espongiforme eran causadas por el mismo tipo de agente infeccioso y publicó su especulación en una carta a la revista médica británica *Lancet*.² Luego de leer la carta publicada y de hablar con Hadlow, Gajdusek quedó convencido de que su primera idea acerca del kuru como enfermedad infecciosa era correcta. Luego de varios años de trabajo finalmente Gajdusek pudo demostrar que el kuru se transmitía por extractos de tejido humano a primates de laboratorio.³ El periodo de incu-

bación entre la inoculación de los animales y la aparición de los síntomas de la enfermedad era de casi dos años. El kuru vino a ser así la primera enfermedad humana en la cual se demostró que la causa era un virus lento.

Varios años antes, Igor Klatzo, perspicaz neuropatólogo de los National Institutes of Health (NIH) había dicho a Gajdusek que una rara enfermedad *hereditaria* llamada enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) producía anomalías en el cerebro que recordaban las del kuru. Tres años después de haber confirmado que el kuru podía transmitirse del hombre a los animales, Gajdusek y sus colaboradores demostraron mediante extractos preparados por biopsia del cerebro de una persona muerta por ECJ que ésta podía transmitirse a los animales.⁴ También había varios casos comprobados en los cuales la ECJ era transmitida de un ser humano a otro durante procedimientos quirúrgicos, como trasplante de córnea, o en extractos de hormona de crecimiento preparada a partir de glándula hipófisis de cadáveres.

¿Cómo se podía vincular una enfermedad hereditaria, como la de Creutzfeldt-Jakob, con la presencia de un agente infeccioso? La respuesta a esta pregunta se ha revelado en los últimos 15 años, principalmente a través del trabajo de Stanley Prusiner y sus colegas de la Universidad de California, en San Francisco. Prusiner comenzó estudiando las propiedades del agente causal de la encefalitis espongiforme y pronto llegó a dos conclusiones muy estimulantes.⁵ Primero, el agente era muy pequeño, mucho más pequeño que cualquier virus conocido, con peso molecular total de 27 000 a 30 000 daltons. Segundo, al parecer el agente carecía de un ácido nucleico entre sus elementos y estaba compuesto exclusivamente de proteínas. Esta segunda conclusión se basaba en el tratamiento exhaustivo de extractos de cerebros infectados con enzimas y otras sustancias capaces de digerir o destruir proteínas o ácidos nucleicos. El tratamiento con enzimas destructoras de proteínas, como enzimas proteolíticas o fenol, producía extractos inofensivos, en tanto que el tratamiento con agentes destructores de ácidos nucleicos, incluyendo diferentes tipos de nucleasas y radiación ultravioleta, no mostraba efecto alguno sobre la infecciosidad. La resistencia del agente de la encefalitis espongiforme a la radiación ultravioleta en comparación con la de los virus se muestra en el cuadro VE 1-1. Prusiner llamó al agente causal de la encefalitis espongiforme, y presumiblemente también del kuru y de la ECJ, un *prión*, derivado de partícula *proteínica infecciosa*.

La idea de un patógeno infeccioso constituido exclusivamente de proteínas fue vista con gran escepticismo, pero estudios subsiguientes de Prusiner y otros no han demostrado manera alguna de modificar la conclusión original. En 1985 se demostró que la proteína prión es codificada por un gen situado dentro de los propios cromosomas de la célula.⁶ El gen se expresa en el tejido cerebral *normal* y codifica una proteína de 254 aminoácidos designada PrP^C (por proteína prión celular), cuya función aún se desconoce. Una forma modificada de la proteína (designada PrP^{Sc}, por proteína prión scrapie) se encuentra en el cerebro de animales con "scrapie". A diferencia de la PrP^C normal, la versión modificada de la proteína se acumula dentro de las células nerviosas formando agregados que aparentemente matan a la células. La PrP^{Sc} no sólo provo-

ca los cambios degenerativos característicos del scrapie en el cerebro, sino también se presume que es el agente infeccioso capaz de transmitir la enfermedad de un animal a otro.

Luego que se descubrió que el scrapie podía ser resultado de la modificación del producto de un gen normal, fue posible explicar cómo una enfermedad genética, como la de Creutzfeldt-Jakob, podía transmitirse de un individuo a otro. Casi todos los genes presentes en el ser humano también lo están en otros mamíferos, y por lo tanto hay una versión humana del PrP. Presumiblemente, si este gen humano sufre algún tipo de mutación, produciría una proteína PrP^{Sc} análoga a la proteína modificada de la oveja en cuanto a su actividad. Como es de esperarse, el análisis del DNA aislado de cierto número de pacientes humanos con ECJ reveló la presencia de mutaciones específicas en el gen que codifica PrP (fig. VE 1-1).⁷ En los últimos años, el análisis genético de la susceptibilidad a enfermedades causadas por priones depende de ratones sometidos a procesos particulares de ingeniería genética. Se han desarrollado dos tipos de ratones modificados: unos que carecen por completo del gen PrP (a los cuales se denomina ratones "sin sentido" carentes de PrP) y otros que contienen una o más copias de la forma mutada del gen PrP humano (a los que se les da el nombre de ratones transgénicos PrP).

Puesto que la proteína PrP se produce normalmente en el cerebro (y otros órganos de los ratones), podría esperarse que la ausencia del gen causara consecuencias terribles con desarrollo de la conducta de ratones carentes de PrP. Sin embargo, a pesar de esta expectativa los ratones que carecen del gen PrP no muestran los efectos de la enfermedad.⁸ Hay varias explicaciones razonables para este resultado, incluyendo la posibilidad de que la función normal de la proteína PrP sea sustituida por otra proteína producida por un gen relacionado; en otras palabras, el ratón tiene un sistema "de respaldo" que puede dispensar la proteína PrP. De cualquier manera, los ratones que carecen del gen PrP y por lo tanto no pueden sintetizar proteína PrP^C, no desarrollan el scrapie cuando se inyectan en su cerebro priones de ratones con scrapie (fig. VE 1-2).⁹ Así pues, para que un ratón sea susceptible a la enfermedad, el

CUADRO VE 1-1. Inactivación de agentes infecciosos pequeños por radiación UV a 254 nm

Ejemplo	D ₃₇ (J/m ²)*
Bacteriófago T2	4
Bacteriófago S13	20
Bacteriófago ΦX174	20
Virus del sarcoma de Rous	150
Poliomavirus	240
Virus de la leucemia de Friend	500
Virus de la leucemia murina	1 400
Viroide de los tubérculos fusiformes de la patata	5 000
Agente del "scrapie" (encefalitis espongiforme)	42 000

* D₃₇ es la dosis de radiación que permite una supervivencia de 37 por ciento.

Reimpreso, con permiso, según S.B. Prusiner, *Science* 216:140, 1982. Copyright 1982 American Association for the Advancement of Science.

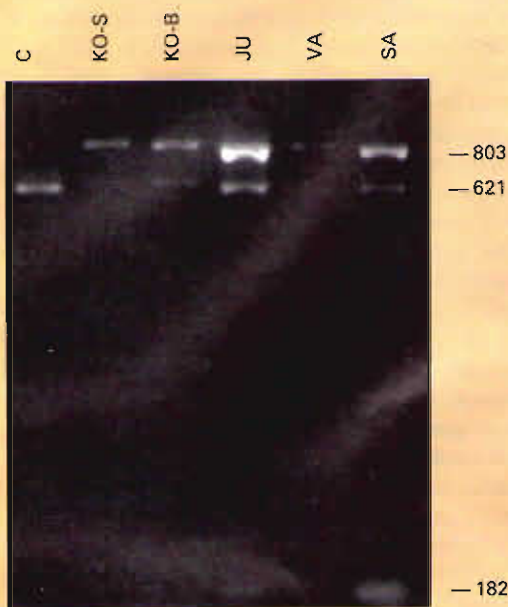
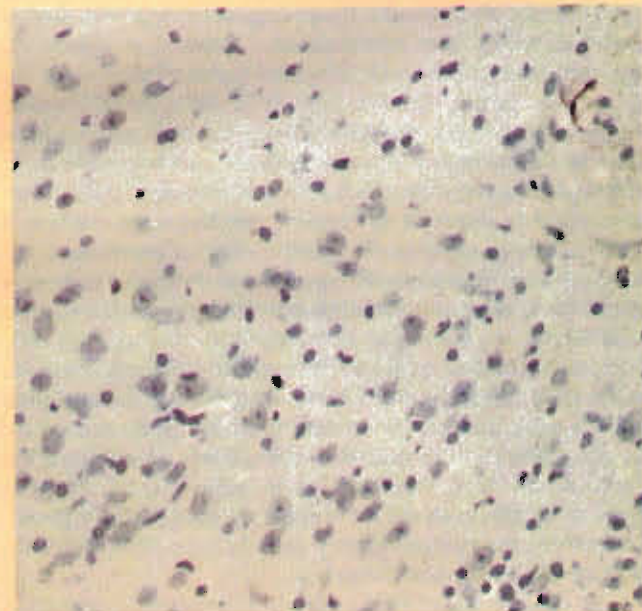


FIGURA VE 1-1. Esta figura muestra la fotografía de un gel en el cual el DNA del gen PrP de algunas personas diferentes se trató con una enzima (llamada BsmA1), que desdobla el DNA en cualquier punto donde encuentra una secuencia particular de nucleótidos. Luego de incubar el DNA con la enzima, el gel es sometido a electroforesis, que separa todos los segmentos presentes en la mezcla de reacción. Las marcas en la parte de arriba indican los individuos de los cuales se obtuvo el DNA y los números a la derecha indican la longitud de los fragmentos de DNA (expresada en pares de bases) visibles dentro del gel. (El DNA se hace visible incubando el gel con un DNA unido a un colorante fluorescente.) La vía indicada por C muestra el DNA de un individuo saludable, las siguientes tres vías (marcadas KO-S, KO-B y JU) muestran el DNA de pacientes con ECJ miembros de familias en las cuales la enfermedad es común. Las dos últimas vías muestran el DNA de dos pacientes con casos esporádicos de ECJ, o sea, casos donde no hay muestras de la enfermedad en otros miembros de la familia. Cuando el DNA del gen PrP de cada uno de los pacientes con ECJ se trata con la enzima, se observa que la mitad del DNA es resistente a la enzima. Esta resistencia está indicada por la presencia de fragmentos de DNA más largos, 803 pares de bases. Por lo contrario, todo el DNA PrP de la persona saludable es desdoblado por la enzima según se manifiesta por la ausencia de los 803 fragmentos de pares de bases. En lugar de eso, este segmento de DNA se fragmenta en dos pedazos, uno de 621 pares de bases y el otro de 182 pares de bases de longitud. La mitad del PrP DNA (que representa un alelo) de los pacientes con ECJ no es fragmentada por la enzima debido a que su secuencia de nucleótidos cambió por una mutación. El alelo mutado ya no contiene la secuencia que la enzima reconoce como un sitio potencial de fragmentación. Todos estos pacientes con ECJ tienen la misma mutación: un cambio del nucleótido G a nucleótido A en el codón 200 que provoca un cambio de glutamina a lisina en la proteína codificada. Este cambio en la secuencia de aminoácidos causa la enfermedad. (Cortesía de Lev Goldfarb.)



(a)



(b)

FIGURA VE 1-2 a) Aspecto microscópico de la porción talámica del cerebro de un ratón afectado de encefalitis espongiforme como resultado de la inoculación previa con priones de "scrapie". El tejido cerebral muestra degeneración espongiforme. b) Aspecto de una porción correspondiente del cerebro de un ratón manipulado genéticamente que carece del gen PrP normal. Igual que el ratón en a, este ratón también fue inyectado con priones de "scrapie" 20 semanas antes, pero debido a que carece del gen PrP y por lo tanto no tiene capacidad para producir la proteína PrP, no es susceptible al agente infeccioso y su tejido cerebral aparece normal. (Cortesía de Adriano Aguzzi y C. Weissmann.)

animal debe ser capaz de producir la proteína PrP en sus propios genes; no es suficiente que se introduzca en su cuerpo la proteína anormal. Estos datos apoyan la hipótesis de que la proteína PrP es indispensable para la propagación del prión durante la infección. Como se hizo notar antes, también se han efectuado estudios empleando ratones transgénicos; o sea, ratones sometidos a ingeniería genética para que sean portadores de genes extraños entre sus cromosomas. Cuando se transfirió a los ratones un gen PrP humano mutado, los animales transgénicos desarrollan el mismo tipo de enfermedad cerebral neuropatológica como la observada en el hombre.¹⁰ Este experimento demuestra que la presencia de un solo gen mutado, que codifica una sola proteína anormal, es suficiente para causar todos los síntomas que acompañan a la devastadora enfermedad neurológica.

PREGUNTAS SIN RESPUESTA

Todavía está sujeta a controversia la idea de que un agente formado por una sola proteína puede provocar una enfermedad infecciosa. Algunos biólogos opinan que la proteína prión se acompaña de pequeños fragmentos de un ácido nucleico todavía por descubrirse; otros piensan que la proteína prión hace que el individuo sea susceptible a la infección por un segundo agente, por ejemplo, un virus que realmente causa la enfermedad. El desarrollo de la enfermedad en los ratones transgénicos por un gen mutante que codifica la proteína prión es un argumento para que la proteína sea la única causa, pero este dato reforzaría mucho la hipótesis si se pudiera demostrar que los extractos de cerebro de ratones transgénicos pueden transmitir la enfermedad a ratones normales no transgénicos. En la actualidad, los intentos para transmitir la enfermedad de esta manera sólo han tenido éxito limitado y el asunto todavía permanece confuso.¹¹

Otro tema que permanece sin respuesta es el mecanismo mediante el cual el agente infeccioso incrementa su número (duplicación) dentro de un individuo infectado, como claramente ocurre. En general, sólo se atribuye duplicación a los ácidos nucleicos. ¿Cómo es posible que una proteína produzca más de sí misma? Esta pregunta sin respuesta todavía es uno de los principales "puntos débiles" en el concepto íntegro de los priones como agentes infecciosos. Prusiner y sus colegas han reunido pruebas que sugieren que las dos versiones de la proteína PrP, PrP^C y PrP^{Sc}, difieren en su estructura tridimensional (conformación). En otras palabras, la misma proteína puede existir en dos formas diferentes.¹² Según esta hipótesis, la

proteína normalmente existe en la forma PrP^C. Sin embargo, en el ser humano o los animales que desarrollan enfermedades prión se favorece la formación de la estructura PrP^{Sc} y se acumula la proteína anormal. En el caso de enfermedades infecciosas por prión, como el kuru o el scrapie, Prusiner sugiere que la duplicación se inicia cuando una versión scrapie de la proteína PrP se une a la proteína PrP normal (o una versión no desplegada de la proteína), que transforma la proteína normal en la forma modificada.¹³ Por lo tanto, si una molécula PrP^{Sc} se une a una PrP^C, este hecho generaría dos moléculas PrP^{Sc} que podrían entonces enlazarse a dos moléculas más de PrP^C produciendo cuatro moléculas PrP^{Sc}, y así sucesivamente.

Aunque las enfermedades prión son muy raras, otros trastornos degenerativos nerviosos, como las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson, son muy comunes. Se espera que el estudio de las enfermedades prión será útil para entender la base de padecimientos humanos más comunes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Farquhar, J. y Gajdusek, D.C. 1981. *Kuru*. Raven Press.
2. Hadlow, W.J. 1959. Scrapie and kuru. *Lancet* 2:289-290.
3. Gajdusek, D.C. y cols. 1966. Experimental transmission of a kuru like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209:794-796.
4. Gibbs, C.J. Jr. y cols. 1968. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): Transmission to the chimpanzee. *Science* 161:388-389.
5. Prusiner, S.B. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136-144.
6. Oesch, B. y cols. 1985. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-39 protein. *Cell* 40:735-746.
7. Goldfarb, L.G. 1990. Identical mutations in unrelated patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 336:174-175.
8. Büeler, H. y cols. 1992. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 336:577-582.
9. Büeler, H. y cols. 1993. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73:1339-1347 (updated in *Cell* 77:967-968.)
10. Hsiao, K.K. y cols. 1990. Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein of Gerstmann-Strausler syndrome. *Science* 250:1587-1590.
11. Hsiao, K.K. y cols. 1994. Serial transmission in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:9126-9130.
12. Pan, K.M. y cols. 1993. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:10962-10966.
13. Cohen, F.E. y cols. 1994. Structural clues to prion replication. *Science* 264:530-531.

SINOPSIS

La teoría celular tiene tres dogmas. 1) Todos los organismos se componen de una o más células; 2) la célula es la unidad de organización básica de la vida, y 3) todas las células se originan de células previas (p. 2).

Las características de la vida, según se manifiestan en las células, se pueden describir mediante un conjunto de propiedades. Las células son muy complejas, su estructura está

altamente organizada y es predecible. La información para construir una célula está codificada en sus genes. Las células se reproducen por división celular; el suministro de energía para sus actividades proviene de la energía química; ejecutan reacciones químicas controladas por enzimas; participan en un gran número de actividades mecánicas; responden a estímulos, y son capaces de un notable nivel de autorregulación (p. 3).

Las células pueden ser procariotas o eucariotas. Las células procariotas sólo se encuentran entre las bacterias, en tanto que todos los otros tipos de organismos, protistas, hongos, plantas y animales, están compuestos de células eucariotas. Las células procariotas y las eucariotas comparten muchas características comunes, incluyendo una membrana celular similar, un sistema común para almacenar y utilizar información genética y vías metabólicas similares. Las células procariotas son el tipo más simple, carecen de organelos membranosos complejos (p. ej., retículo endoplásmico, complejo de Golgi, mitocondrias y cloroplastos), cromosomas y estructuras citoesqueléticas características de las células eucariotas. Los dos tipos de células también se pueden distinguir por sus mecanismos de división celular, sus estructuras locomotoras y el tipo de pared celular que producen (en caso de que hubiera alguna pared celular) (p. 7).

Los organismos eucariotes multicelulares se componen de células especializadas en diferentes actividades. Las células del moho del fango son un sistema útil para estudiar la diferenciación celular debido a que su etapa multicelular consta de sólo dos tipos básicos de células: las que producen el tallo del cuerpo frutal y las que producen las esporas. Por lo contrario, la mayor parte de las plantas y animales constan de docenas de diferentes tipos de células, cada una de las cuales tiene su propia estructura y función distinta (p. 14).

Casi todas las células siempre son de tamaño microscópico. Las células bacterianas típicamente son de uno a 5 μm de lon-

gitud, en tanto que las células eucariotas en condiciones típicas son de 10 a 30 μm . Las células son de tamaño microscópico por algunas razones: su núcleo posee un número limitado de copias de cada gen, la superficie (que sirve como área de intercambio entre la célula) se convierte en un factor limitante a medida que la célula aumenta de tamaño y la distancia entre la superficie de la célula y su interior también sería demasiado grande para que la célula satisfaga sus necesidades mediante simple difusión (p. 15).

Los virus son patógenos no celulares que sólo pueden reproducirse cuando están presentes dentro de una célula viva. Fuera de la célula, el virus existe como un paquete de macromoléculas, o virión. Los viriones presentan gran variedad de formas y tamaños, pero todos ellos constan de ácido nucleico viral encerrado en una cubierta que contiene proteínas virales. Las infecciones virales pueden producir: 1) destrucción de la célula huésped con producción acompañante de cepas virales, o 2) integración del ácido nucleico viral al DNA de la célula huésped que con frecuencia altera las actividades de dicha célula. Los virus no son una forma primitiva de vida, sino más bien han evolucionado secundariamente a partir de fragmentos de cromosomas celulares (p. 17).

Los viroides y priones son patógenos que se cree contienen sólo RNA y proteína, respectivamente. Los viroides causan cierto número de enfermedades en las plantas, en tanto que los priones producen enfermedades neurológicas mortales en el ser humano y otros mamíferos (p. 21).

PREGUNTAS DE REPASO

- ¿Cuáles son las propiedades fundamentales que comparten todas las células? Describir la importancia de cada una de estas propiedades.
- Describir algunas de las características de las células que sugieren que todos los organismos vivos se derivan de un ancestro común.
- ¿Cuál es la fuente de energía que apoya la vida sobre la tierra? ¿Como se pasa la energía de un organismo al siguiente?
- Comparar las células procariotas y las eucariotas según diferencias estructurales, funcionales y metabólicas.
- ¿Cuál es la importancia de la diferenciación celular?
- ¿Por qué casi todas las células siempre son microscópicas?
- ¿Qué propiedades distinguen a un virus de una bacteria?
- ¿Por qué se piensa que los virus evolucionaron a partir de formas de vida celular en vez de lo inverso?
- Si una mitocondria tiene 2 μm de longitud, ¿cuántos angstroms tendría?, ¿cuántos nanómetros?, ¿cuántos milímetros?
- Comparar y contrastar: nucléotido y núcleo; flagelo de una bacteria y de un espermatozoide; miembros del subreino Archaeobacteria y una cianobacteria; células precursoras de esporas y precursoras del tallo de una célula del moho del fango; fijación de nitrógeno y fotosíntesis; bacteriófagos y virus del mosaico del tabaco; provirus y virión; viroides y priones.

PREGUNTAS ANALÍTICAS

- Considere alguna pregunta acerca de la estructura o la función de las células que le interese responder. ¿Los datos requeridos para responder la pregunta serían más fáciles de recolectar trabajando en un animal o en una planta íntegros o en una población de células cultivadas? ¿Cuáles serían las ventajas y desventajas de trabajar en un organismo íntegro en comparación con un cultivo de células?
- La figura 1-3 muestra una célula epitelial del intestino con numerosas microvellosidades. ¿Cuál es la ventaja del organismo de poseer estas microvellosidades? ¿Qué se esperaría que le ocurriera a un individuo que carezca de dichas microvellosidades como resultado de una mutación hereditaria?
- Las primeras células humanas que se cultivaron con éxito se derivaron de un tumor maligno ¿Cree usted que esto sólo refleja la disponibilidad de células cancerosas, o que estas células son mejores sujetos para cultivo celular? ¿Por qué?
- Los esquemas de las células vegetales y animales de la figura 1-9, b,c, indican ciertas estructuras presentes en las

células vegetales pero ausentes en las animales. ¿Cómo piensa usted que afecta la vida de la planta cada una de estas estructuras?

5. Habrá usted notado que las células poseen receptores sobre su superficie que les permiten responder a estímulos específicos. Muchas células del cuerpo humano tienen receptores que les permiten enlazar hormonas específicas que circulan en la sangre. ¿Por qué cree usted que estos receptores hormonales son importantes? ¿Cuál sería el efecto sobre las actividades fisiológicas del cuerpo si las células carecieran de estos receptores, o si todas las células tuvieran los mismos receptores?
6. Hans Driesch no fue el primero en comprobar la potencialidad de una de las dos primeras células de un embrión. Unos pocos años antes, el embriólogo alemán Wilhelm Roux mató una de las primeras dos células de un huevo de rana con una aguja caliente y luego observó el destino de la célula viva. Notó que la célula se desarrolló en lo que prácticamente era la mitad de un embrión. ¿Cree usted que estos experimentos indican que los mecanismos que gobiernan el desarrollo de las ranas son fundamentalmente diferentes de los que gobiernan el desarrollo de los erizos de mar? ¿Hay alguna manera de reconciliar estos dos experimentos según la forma en que se efectuaron?
7. Si asumimos que las actividades dentro de las células ocurren de manera análoga a la demostrada en la caricatura de

Rube Goldberg en la figura 1-8, ¿en qué difieren de una actividad humana, como construir un carro en una línea de ensamblado o encestar un tiro libre en un juego de baloncesto?

8. A diferencia de las células bacterianas, el núcleo de una célula eucariota está rodeado de una membrana de doble capa tachonada con poros complejos. ¿Cómo piensa usted que esto pueda afectar al tráfico entre el DNA y el citoplasma de una célula eucariota en comparación con una célula procariota?
9. Examinar la fotografía del protozoo ciliado de la figura 1-16 y considerar algunas de las actividades en las cuales participa esta célula y en las cuales no participa una célula muscular o una nerviosa de su propio cuerpo.
10. ¿Qué tipo de células pensaría usted que alcanzarían el mayor volumen: una célula muy aplanada o una esférica? ¿Por qué?
11. Observe la estructura del adenovirus y del HIV esquematizada en la figura 1-21. ¿Piensa usted que sería más fácil desarrollar una vacuna utilizando la cubierta proteínica del adenovirus en comparación con la proteína gp120 del HIV? ¿Por qué sí o por qué no?
12. Si usted tuviera que argumentar acerca de que los virus son organismos vivos, ¿qué características estructurales y funcionales del virus podría utilizar para apoyar su argumentación?

BIBLIOGRAFIA

Referencias generales en microbiología y virología

- Balows, A., ed. 1992. *The Prokaryotes*. 4 vols., Springer-Verlag.
- Brock, T.D. y Madigan, M.T. 1990. *Biology of Microorganisms*, 6a. edición, Prentice-Hall.
- Davis, B.D. y cols. 1990. *Microbiology*. 4a. edición, Lippincott.
- Dulbecco, R. y Ginsberg, H.S. 1991. *Virology*, 3a. edición, Lippincott.
- Fields, B.N. y Knipe, D.M. eds. 1990. *Fundamental Virology*, Raven.
- Levine, A. 1992. Viruses. *Scientific American Library*.
- Stainer, R.Y. y cols. 1986. *The Microbial World*. 5a. edición, Prentice-Hall.

Relatos históricos y personales

- Bearn, A.G. 1993. *Archibald Garrod and the Individuality of Man*. Oxford Univ. Press.
- Fruton, J.S. 1992. *A Skeptical Biochemist*. Harvard Univ. Press.
- Holmes, F.L. 1993. *Hans Krebs*. 2 vols., Oxford Univ. Press.
- Keller, E.F. 1983. *A Feeling for the Organisms: The Life and Work of Barbara McClintock*. W.H. Freeman.
- Kohn, A. 1984. *Fortune or Failure: Missed Opportunities and Chance Discoveries in Science*. Blackwell.
- Kornberg, A. 1991. *For the Love of Enzymes: The Odyssey of a Biochemist*. Cambridge Univ. Press.
- Lederberg, J. ed., 1990. *The Excitement and Fascination of Science: Reflections by Eminent Scientists*, vol. 3. Ann. Revs., Inc.
- Levi-Montalcini, R. 1988. *In Praise of Imperfection*. Basic Books.
- MacFarlane, G. 1984. *Alexander Fleming: The Man and the Myth*. Hogarth Press.

McCarty, M. 1985. *The Transforming Principle: Discovering that Genes Are Made of DNA*. Norton.

Pyke, D. ed. 1990. *The Threat and the Glory: Reflections on Science and Scientists*. Harper-Collins.

Serafini, S. 1989. *Linus Pauling: A Man and His Science*. Paragon.

Watson, J.D. 1968. *The Double Helix*. Atheneum.

Lecturas generales

- Barlow, C. ed., 1991. *From Gaia to Selfish Genes*. MIT Press.
- Bendall, D.S., ed., 1983. *Evolution from Molecules to Men*. Cambridge Univ. Press.
- DeDuke, C. 1991. *Blueprint for a Cell: The Nature and Origin of Life*. Neil Patterson Pub.
- Gray, M.W. 1989. The evolutionary origins of organelles. *Trends Genetics* 5:294-299.
- Judson, H.F. 1979. *The Eighth Day of Creation*. Simon & Schuster.
- Moore, J.A. 1993. *Science as a Knowing*. Harvard Univ. Press.
- Nossal, G.J.V. 1985. *Reshaping Life*. Cambridge Univ. Press.
- Thomas, L. 1974. *Lives of a Cell: Notes of a Biology Watcher*. Viking.
- Vidal, G. 1984. The oldest eukaryotic cells. *Sci. Am.* 250:48-57 (feb.).
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Revs.* 51:221-271.

Vacuna contra el SIDA

- Cohen, J. y cols. 1993. AIDS: The uncensored questions. *Science* 260:1254-1293.
- Emini, E.A. 1995. Hurdles in the path to an HIV-1 vaccine. *Science and Medicine* 2:38-47 (mayo/junio).
- Koff, W.C. 1994. The next steps toward a global AIDS vaccine. *Science* 266:1335-1337.

Bases químicas de la vida

2-1 Enlaces covalentes

La perspectiva humana: Radicales libres como causa de envejecimiento y enfermedad

2-2 Enlaces no covalentes

2-3 Ácidos, bases y amortiguadores

2-4 Naturaleza de las moléculas biológicas

2-5 Cuatro familias de moléculas biológicas

2-6 Formación de estructuras macromoleculares complejas

La vía experimental: Construcción de la estructura de una proteína

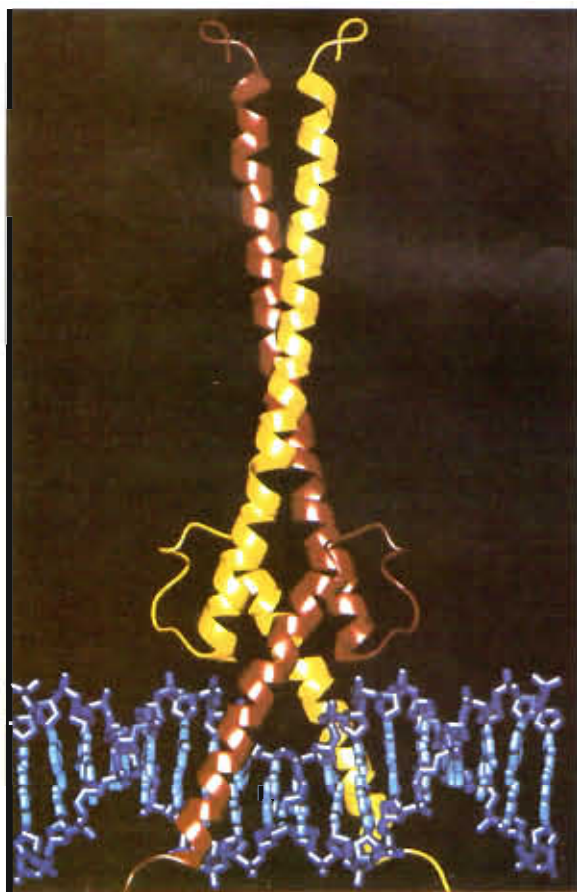


FIGURA 2-1. Complejo formado por dos macromoléculas diferentes. Una parte de la molécula de DNA (mostrada en azul) se une para formar un complejo a una proteína que consta de dos subunidades de polipéptidos, una roja y la otra amarilla. Las partes de la proteína que se observan dentro de los surcos del DNA han reconocido una secuencia específica de nucleótidos en la molécula del ácido nucleico y se enlazan a ella. (Cortesía de A.R. Ferré-D'Amaré y Stephen K. Burley, The Rockefeller University.)

Este capítulo se inicia con una breve exposición de las bases atómicas de la materia, un tema que puede parecer fuera de lugar en un libro de texto de biología. Pero el nivel de organización celular sólo es un pequeño avance después del nivel atómico, como veremos al examinar la importancia de los movimientos de algunos átomos de las moléculas durante actividades como contracción muscular o transporte de sustancias a través de membranas celulares. Las actividades de las células y sus organelos se derivan directamente de la actividad de las moléculas que las constituyen. Consideremos un proceso como la división celular, que puede seguirse en sus detalles más minuciosos bajo el simple microscopio de luz. Para entender las actividades que tienen lugar cuando una célula se divide es necesario conocer, por ejemplo, algo acerca de las interacciones entre DNA y moléculas de proteína cuyo resultado es la condensación de los cromosomas en paquetes con forma de bastoncillos que pueden ser separados en células diferentes; la construcción molecular de microtúbulos que contienen proteínas que permite a estas estructuras en forma de bastoncillos huecos desensamblarse en determinado momento y volverse a ensamblar en el siguiente instante en un sitio por completo diferente de la célula; y las propiedades de las moléculas de lípidos que confieren a la membrana celular externa su plasticidad, de modo que pueda ser empujada a la mitad de la célula y seccionarla en dos. Es imposible incluso tratar de entender la fisiología celular básica sin un conocimiento razonable de la estructura y las propiedades de los principales tipos de moléculas biológicas. Este es el objetivo del presente capítulo: suministrar la información necesaria acerca de la química de la vida para que el lector comprenda las bases de la vida. Iniciaremos considerando los tipos de enlaces que pueden formar los átomos entre sí.

2-1 Enlaces covalentes

Los átomos que constituyen una molécula se mantienen unidos por **enlaces covalentes**, en los cuales los pares de átomos comparten pares de electrones. La formación de un enlace covalente entre dos átomos obedece el principio fundamental de que un átomo es más estable cuando su capa electrónica más externa está completa. Por consiguiente, el número de enlaces que un átomo puede formar depende del número de electrones necesarios para completar dicha capa externa. En la figura 2-1 se muestra la estructura electrónica de algunos átomos. La capa exterior (única) de los

átomos de hidrógeno o de helio se llena cuando contiene dos electrones; la capa externa de los otros átomos de la figura 2-1 se llena cuando contiene 8 electrones. Así, un átomo de oxígeno con seis electrones en su capa externa puede llenar esta capa combinándose con dos átomos de hidrógeno para formar una molécula de agua. Los átomos de oxígeno y de hidrógeno se unen mediante un enlace covalente *simple* (representado por $\text{H}:\text{O}$ o $\text{H}-\text{O}$). En la formación de un enlace covalente se libera energía que posteriormente debe reabsorberse cuando se rompe el enlace. La energía requerida para desdoblar los enlaces covalentes $\text{C}-\text{H}$, $\text{C}-\text{C}$ o $\text{C}-\text{O}$ es muy grande, en general entre 80 y

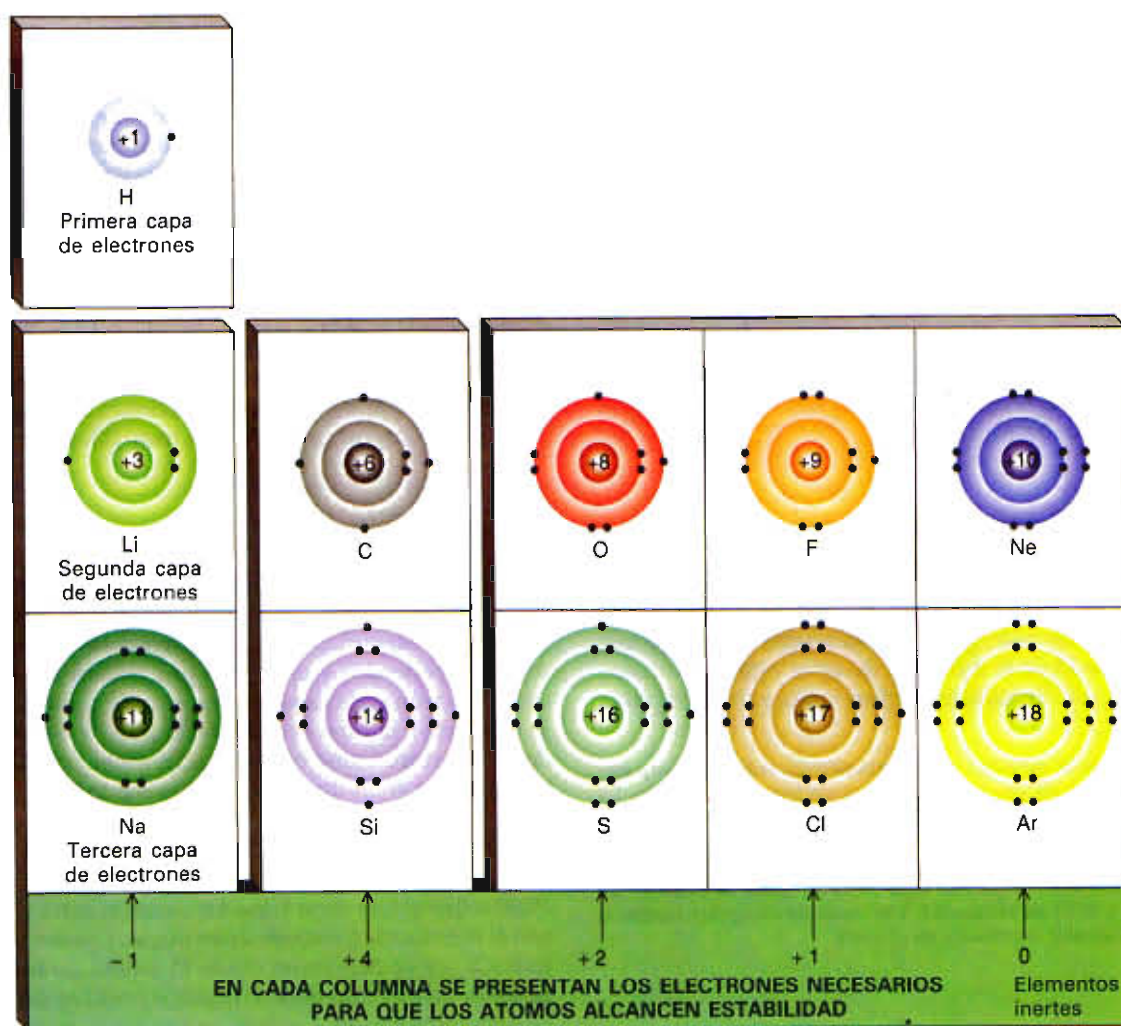


FIGURA 2-1. Representación de la disposición de los electrones en algunos átomos comunes. Los electrones rodean al núcleo de un átomo formando una "nube" u *orbitales*, generalmente definidos por sus límites, los cuales pueden tener forma esférica o de mancuerna. Cada orbital contiene un máximo de dos electrones y por esa razón los electrones se agrupan en pares (puntos oscuros en la figura). La capa más interna contiene un solo orbital (por lo tanto, dos electrones); la segunda capa contiene cuatro orbitales (por lo tanto, 8 electrones); la tercera capa también contiene cuatro orbitales, y así sucesivamente. El número de electrones en la capa más externa es el determinante principal de las propiedades químicas de un elemento. Los átomos con número similar de electrones en su capa externa tienen propiedades semejantes. Por ejemplo, litio (Li) y sodio (Na) tienen un electrón en su capa más externa y ambos son metales muy reactivos. Los átomos de carbono (C) y de silicio (Si) se unen cada uno con cuatro diferentes átomos. Sin embargo, debido a su tamaño, un átomo de carbono se puede unir a otros átomos de carbono y formar moléculas orgánicas de cadena larga, en tanto que el silicio no puede formar moléculas comparables. El neón (Ne) y el argón (Ar) tienen llenas sus capas externas y por consiguiente estos átomos son muy poco reactivos; se les conoce como gases inertes.

100 kilocalorías por mol (kcal/mol)¹ de moléculas, por lo que estos enlaces son estables en casi cualquier situación.

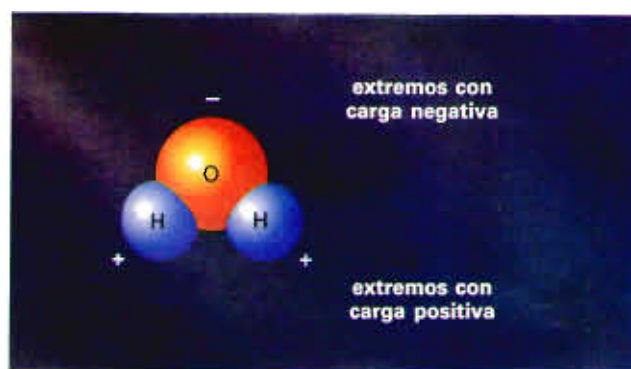
En muchos casos, dos átomos pueden unirse mediante enlaces en los cuales se comparte más de un par de electrones. Cuando se comparten dos pares de electrones, como ocurre en la molécula de oxígeno (O₂), el enlace covalente es un *doble enlace*, y si se comparten tres pares de electrones (como en el nitrógeno molecular, N₂), es un *triple enlace*. No hay enlaces cuádruples. El tipo de enlace entre los átomos tiene importantes consecuencias para definir la forma de las moléculas. Por ejemplo, los átomos con un solo enlace pueden girar entre sí, en tanto que los átomos con doble (y triple) enlace carecen de esa capacidad.

Cuando los átomos unidos son del mismo tipo, como en H₂, el par de electrones de la capa externa se comparten por igual entre los dos átomos de la pareja. Sin embargo, cuando dos átomos diferentes se enlazan en forma covalente, es inevitable que el núcleo de un átomo con carga positiva ejerza mayor fuerza de atracción sobre los electrones externos que la fuerza ejercida por el átomo al cual están enlazados. En consecuencia, los átomos compartidos tienden a localizarse más cerca del átomo con mayor fuerza de atracción, o sea, el átomo más **electronegativo**. La electronegatividad de un átomo depende de dos factores: 1) El número de cargas positivas en su núcleo (más protones, más electronegatividad) y 2) la distancia del núcleo a los electrones externos (a mayor distancia menor electronegatividad). En el cuadro 2-1 se ordena la electronegatividad de átomos comunes en una escala de 0 a 4. Entre los átomos más frecuentes en las moléculas biológicas, nitrógeno y oxígeno son fuertemente electronegativos.

Moléculas polares y no polares

Examinemos una molécula de agua. Los átomos de oxígeno del agua atraen a los electrones con mucha mayor fuerza que los átomos de hidrógeno. Como resultado, se dice que los enlaces O—H de la molécula de agua están *polarizados*, de modo que uno de los átomos tiene carga parcial negativa

y el otro carga parcial positiva. Esto generalmente se expresa de la siguiente manera:



Moléculas como las del agua, con distribución asimétrica de carga eléctrica, se dice que son moléculas **polares**. Las moléculas polares de importancia biológica contienen uno o más átomos electronegativos, de ordinario O, N, S o P. Las moléculas que carecen de enlaces polarizados, como las que contienen casi exclusivamente átomos de carbono e hidrógeno, se dice que son **no polares**. La presencia de enlaces polarizados tiene gran importancia para determinar la reactividad de las moléculas. Las moléculas que carecen de átomos electronegativos, como ceras y grasas, tienden a ser relativamente inertes. Algunas moléculas de mayor interés biológico, incluyendo proteínas y fosfolípidos, que estudiaremos más adelante, contienen porciones polares y no polares que se comportan de manera muy diferente.

Ionización

Hay átomos tan fuertemente electronegativos que durante una reacción química pueden capturar electrones de otros átomos, por ejemplo, cuando los elementos sodio (un metal de color plateado) y cloro (un gas tóxico) se mezclan, el único electrón en la capa más externa de cada átomo de Na se desplaza a la capa externa del átomo de cloro deficiente de un electrón. Como consecuencia, estos dos elementos se transforman en átomos cargados, o sea **iones**.



Puesto que el ion cloro tiene un electrón extra (en relación con el número de protones de su núcleo), posee carga negativa (Cl⁻) y se denomina *anión*. El átomo de sodio que ha perdido un electrón tiene una carga positiva extra (Na⁺) y se denomina *catión*. Cuando ambos iones se presentan en forma cristalina forman cloruro de sodio, la sal de mesa común.

Los iones Na⁺ y Cl⁻ mencionados antes son relativamente estables porque sus capas más externas están completas. Una disposición diferente de electrones dentro del átomo puede producir especies muy reactivas denominadas *radicales libres*. En el ensayo siguiente *La perspectiva humana* se considera la estructura de los radicales libres y su importancia en biología.

¹ Una caloría es la cantidad de energía térmica requerida para elevar la temperatura de un gramo de agua un grado centígrado. La Caloría (gran caloría) es igual a 1 000 calorías (o kilocaloría). La energía expresada en calorías también puede expresarse en joules, término histórico utilizado para medir energía en forma de trabajo. Una kilocaloría equivale a 4 186 joules. Una mola es igual al número de Avogadro (6 × 10²³) de moléculas. Una mola de cualquier sustancia es su peso molecular expresado en gramos.

CUADRO 2-1. Electronegatividad de los átomos

+1*	+4	+5	+6	+7
H	C	N	O	F
2.2	2.5	3.0	3.5	4.0
	Si	P	S	Cl
	1.9	2.2	2.5	3.0

* Los números + corresponden al renglón del átomo en la tabla periódica.

2-2 Enlaces no covalentes

Las uniones covalentes son enlaces fuertes formados entre los átomos de una molécula. Las interacciones *entre* moléculas (o entre las diferentes partes de una molécula biológica grande) están gobernadas por una gran variedad de uniones más débiles denominadas **enlaces no covalentes**. Los enlaces no covalentes no dependen de electrones compartidos, sino más bien de fuerzas de atracción entre regiones con diferente carga eléctrica, negativa o positiva, dentro de la misma molécula o entre dos moléculas cercanas. Los enlaces no covalentes individuales son débiles (casi 1 a 5 kilocalorías por mol) y por lo tanto se rompen y se vuelven a formar con rapidez. Esta característica permite a los enlaces no covalentes mediar interacciones dinámicas que ocurren entre las moléculas del interior de la célula. Sin enlaces no covalentes no podrían ocurrir actividades vitales como las reacciones metabólicas, la duplicación del DNA y el movimiento de materiales dentro de la célula.

Aunque individualmente los enlaces no covalentes son débiles, cuando un gran número de ellos ocurren juntos, como entre las dos cadenas del DNA o entre las diferentes partes de una proteína grande, sus fuerzas de atracción son aditivas y consideradas en conjunto confieren gran estabilidad a la estructura. Los enlaces no covalentes son de varios tipos.

Enlaces iónicos: atracción entre átomos cargados

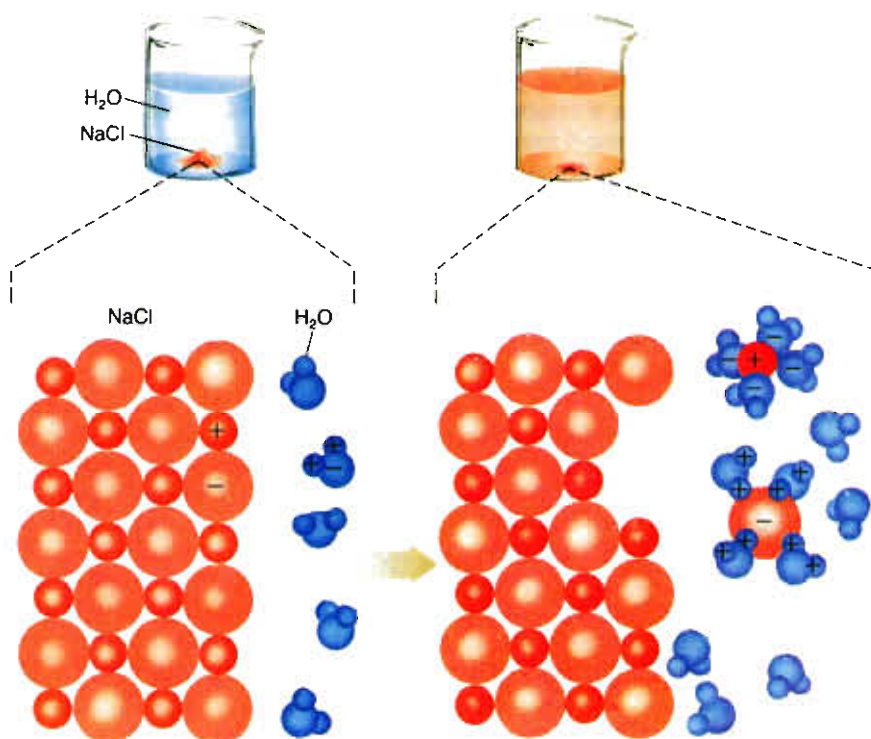
Un cristal de sal de mesa se mantiene unido por atracción electrostática entre los iones Na^+ cargados positivamente y

los iones Cl^- cargados negativamente. Este tipo de atracción entre componentes con carga neta se denomina **enlace iónico** (o *punto salino*). Los enlaces iónicos dentro de un cristal de sal pueden ser muy fuertes, pero la presencia de agua impide la formación de enlaces iónicos fuertes. Por ejemplo, si se disuelve en agua un cristal de sal, cada uno de los iones individuales queda rodeado por moléculas de agua que impiden la aproximación de iones con carga opuesta (fig. 2-2). Puesto que las células se componen principalmente de agua, el enlace entre iones *libres* es de poca importancia. En contraste, pueden formarse enlaces iónicos débiles entre grupos con carga opuesta que forman parte de moléculas biológicas más grandes. Por ejemplo, cuando los radicales fosfato de la molécula de DNA cargados negativamente se aproximan mucho a grupos cargados positivamente de la superficie de una proteína (fig. 2-3), los grupos con carga opuesta forman enlaces iónicos que ayudan a mantener unido al complejo. (Inversamente, los grupos con carga similar se repelen entre sí y evitan una aproximación estrecha.) En una célula, la fuerza de los enlaces iónicos generalmente es débil debido a la presencia de agua, pero en la profundidad del núcleo de una proteína, donde casi siempre no hay agua, estos enlaces pueden ejercer gran influencia.

Enlaces de hidrógeno

Cuando un átomo de hidrógeno se enlaza en forma covalente a un átomo electronegativo, en particular a un átomo de oxígeno o de nitrógeno, el único par de electrones compartidos se desplaza mucho hacia el núcleo del átomo electronegativo, dejando con carga parcial positiva al átomo de

FIGURA 2-2. Disolución de un cristal de sal. Cuando se coloca un cristal de sal en agua, los iones Na^+ y Cl^- quedan rodeados por moléculas de agua que separan los enlaces iónicos entre los dos iones. A medida que la sal se disuelve, los átomos de oxígeno con carga negativa de las moléculas de agua se asocian a los iones sodio con carga positiva y los átomos de hidrógeno con carga positiva de las moléculas de agua se asocian a los iones cloro con carga negativa.

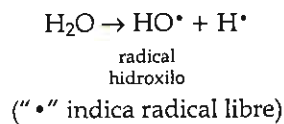


LA PERSPECTIVA HUMANA

Radicales libres como causa de envejecimiento y enfermedad

¿Por qué los seres humanos tienen un periodo de vida máximo de casi 100 años, en tanto que sus parientes cercanos, los chimpancés, sólo viven como la mitad de ese tiempo? Muchos biólogos piensan que el envejecimiento es resultado de un daño gradual que se va acumulando sobre los tejidos de nuestro cuerpo. El daño más destructivo probablemente ocurra en el DNA. Las alteraciones del DNA tienden a producir fallas en los mensajes genéticos que paulatinamente promueven el deterioro celular. ¿Cómo ocurre entonces el daño celular y por qué razón es más rápido en el chimpancé que en el ser humano? La respuesta puede residir a nivel atómico.

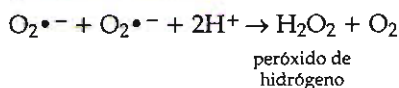
Los átomos son estables cuando sus capas están llenas de electrones. Las capas de electrones constan de orbitales, cada uno de los cuales sólo puede sostener un máximo de dos electrones. Los átomos o moléculas que tienen orbitales con un solo electrón impar tienden a ser muy inestables y se les denomina **radicales libres**. Los radicales libres pueden formarse al romperse un enlace covalente de modo que cada porción conserve la mitad de los electrones compartidos, o también se generan cuando un átomo o molécula acepta un solo electrón transferido durante una reacción de oxidorreducción. Por ejemplo, el agua puede convertirse en radicales libres cuando se expone a la radiación solar



Los radicales libres son en extremo reactivos debido a su inestabilidad y pueden alterar químicamente muchos tipos de moléculas, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. La formación de radicales hidroxilo tal vez sea una de las principales razones de

que la luz del sol sea tan nociva para la piel.

En 1956, Denham Harman, de la Universidad de Nebraska, propuso que el envejecimiento era resultado del daño a los tejidos causado por radicales libres. Puesto que el tema de los radicales libres no era familiar para los biólogos y los médicos, la propuesta no despertó gran interés. Después, en 1969, Joe McCord e Irwin Fridovich, de la Universidad de Duke, descubrieron una enzima, la superóxido dismutasa (SOD), cuya única función era destruir radicales superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), un tipo de radical libre formado cuando el oxígeno capta un electrón extra. La SOD cataliza la siguiente reacción:



El peróxido de hidrógeno, una sustancia muy destructiva, es descompuesto de inmediato por otra enzima, la catalasa.

Investigaciones subsecuentes han revelado que los radicales superóxido se forman dentro de las células durante el proceso oxidativo normal y que en las células de diversos organismos, desde bacterias hasta el ser humano, hay enzimas capaces de destruir estas nocivas sustancias. La importancia de la SOD se aprecia mejor en estudios de bacterias mutantes que carecen de esta enzima; estas células no pueden sobrevivir en presencia de oxígeno.

Aunque el potencial destructivo de los radicales libres, como el superóxido, es incuestionable, la importancia de estos agentes como factor de envejecimiento aún está sujeta a controversia. La hipótesis de Harman en relación con radicales libres y envejecimiento permite hacer ciertas predicciones. Por ejemplo, sería de esperar que los animales con periodos de vida más largos produjeran menor cantidad de radicales libres, posean una mejor capacidad

para destruir radicales libres, o mayor eficiencia para reparar el daño celular producido por las reacciones entre radicales libres. Los datos relacionados con estas predicciones son contradictorios. En tanto que algunos estudios muestran correlación entre concentración elevada de SOD o actividad de enzimas reparadoras y aumento del periodo máximo de vida, otros estudios, en su mayor parte, no concuerdan con eso.

El papel de los radicales libres en el envejecimiento todavía es dudoso, pero cada vez gana mayor aceptación la idea de que estos reactivos agentes desempeñan un papel importante en la aparición de ciertas enfermedades, como cáncer, aterosclerosis y esclerosis lateral amiotrófica (ELA, o enfermedad de Lou Gehrig). Como se analiza en los últimos capítulos, el cáncer casi siempre es resultado de la mutación de ciertos genes claves. Puesto que la mutación genética es resultado de alteraciones en el DNA y los radicales libres pueden dañar al DNA, no es sorprendente que los radicales libres promuevan la formación y crecimiento del cáncer. La aterosclerosis es una enfermedad cardiovascular causada por el depósito de placas de lípidos sobre la pared interna de las arterias. Hay suficientes datos que sugieren que la formación de estas placas ocurre en sitios donde el revestimiento celular de los vasos ha sufrido daño, hecho que puede ser causado por radicales libres. La esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad degenerativa caracterizada por parálisis gradual de las motoneuronas que estimulan los músculos del cuerpo. Aunque la mayor parte de los casos de ELA ocurren de manera esporádica, o sea, la enfermedad no se hereda de padres portadores de un gen defectuoso, casi 10% de los casos sigue un patrón familiar. El vínculo entre daño por radicales libres y ELA fue sugerido por primera vez en 1993 cuan-

do se descubrió que los miembros de cierto número de familias afectadas por la enfermedad poseían un gen que codifica una superóxido dismutasa (SOD) defectuosa. A partir de esta observación, los investigadores introdujeron un gen que codifica una SOD mutante en el ratón y demostraron que los ratones desarrollan una enfermedad neurodegenerativa grave cuyos síntomas recuerdan estrechamente a los de ELA. Puesto que los animales manipulados genéticamente continúan produciendo SOD normal (codificado por los genes normales que conservan) junto con la enzima mutante (codificada por el gen añadido), al parecer el daño no es resultado de la pérdida de actividad de una enzima. Se especula que la enzima mutante quizá posea alguna nueva actividad nociva que tiende a producir nuevos tipos de radicales libres que dañan a las neuronas.

En otra vía de investigación se han empleado sustancias denominadas *antioxidantes* capaces de destruir radicales libres. Los antioxidantes comunes incluyen glutatión, vitaminas E y C, y β -caroteno (el pigmento de color naranja de las zanahorias y de otros vegetales y compuestos precursores de vitamina A). Aunque estas sustancias pueden ser muy benéficas en la dieta debido a su capacidad para destruir radicales libres, estudios en ratas y ratones no suministraron datos convincentes de que retardan el proceso de envejecimiento o que prolongan la vida. En realidad, un estudio reciente, efectuado en Finlandia, en el cual durante ocho años se controló cuidadosamente a casi 30 000 fumadores empedernidos, se observó que los sujetos a quienes se administró complemento de β -caroteno mostraron un porcentaje 18 veces más elevado

de ocurrencia de cáncer pulmonar que aquellos que no recibieron el antioxidante. Este dato es muy difícil de explicar y la mayoría de los investigadores en este campo se resisten a hacer conclusiones, sobre todo porque otros estudios sugieren que las dietas ricas en antioxidantes se relacionan con disminución del cáncer en poblaciones humanas. Estos datos sólo ilustran la complicada relación entre dieta humana y salud, y la dificultad de emplear seres humanos en estudios experimentales.

Para simplificar el tema, también se efectuaron estudios en cultivos de células. Ni la adición de antioxidantes al medio de cultivo, ni la reducción de oxígeno en la atmósfera (que podría disminuir la formación de radicales libres) parece incrementar la capacidad de crecimiento de las células.

hidrógeno. En consecuencia, el núcleo desnudo del átomo de hidrógeno, cargado positivamente, puede aproximarse lo bastante para establecer una interacción de atracción con el par de electrones externos no compartidos de un segundo átomo electronegativo (fig. 2-4). Esta débil atracción recíproca se denomina **enlace de hidrógeno**.

Los enlaces de hidrógeno se forman entre la mayor parte de las moléculas polares y tienen particular importancia para determinar la estructura y propiedades del agua (que estudiaremos después). Los enlaces de hidrógeno también se forman entre grupos polares presentes en moléculas biológicas grandes, como ocurre entre las dos cadenas de la molécula de DNA (fig. 2-3). La fuerza de los enlaces de hidrógeno es aditiva, por lo tanto su gran número entre las cadenas de la doble hélice de DNA le confiere gran estabilidad. Sin embargo, puesto que los enlaces de hidrógeno individuales son débiles (2 a 5 kcal/mol), las dos cadenas pueden separarse para permitir el acceso de las enzimas a sitios particulares de la molécula de DNA.

Interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals

Debido a su capacidad para interactuar con el agua, se dice que las moléculas polares, como azúcares y aminoácidos, que pronto describiremos, son **hidrofílicas** o "amantes del agua". Moléculas no polares, como esteroides o grasas, son prácticamente insolubles en agua debido a que carecen

de regiones cargadas que serían atraídas hacia los polos de las moléculas de agua. Cuando los compuestos no polares se mezclan con agua, la sustancia no polar **hidrofóbica** ("que le teme al agua"), se ven forzados a formar agregados para reducir al mínimo la exposición a sus vecinos polares (fig. 2-5). El agrupamiento de moléculas no polares se denomina **interacción hidrofóbica**. Es la razón por la cual las gotas de grasa reaparecen con rapidez sobre la superficie de una sopa de res o de pollo aun después de agitar el líquido con una cuchara. Como se expone en la página 54, también es la causa de que los grupos no polares tiendan a localizarse en el interior de la mayor parte de las proteínas solubles y en el exterior de casi todas las membranas proteínicas (sección 4-2).

Las interacciones hidrofóbicas del tipo que acabamos de describir no se consideran verdaderos enlaces, puesto que no son consecuencia de una atracción entre moléculas hidrofóbicas. Además de este tipo de interacción, los grupos hidrofóbicos pueden formar enlaces débiles entre sí basados en atracciones electrostáticas. Las moléculas polares se reúnen debido a que siempre contienen dentro de sus estructuras una carga distribuida asimétricamente. Un examen más detallado de los enlaces covalentes en una molécula no polar (como H_2 o CH_4) revela que los electrones no siempre se distribuyen de manera simétrica. La distribución de electrones en cualquier momento dado alrededor de un átomo es estadística, y por lo tanto varía de un instante a otro. En consecuencia, en un momento dado, la densidad de electrones puede ser mayor en un lado del átomo,

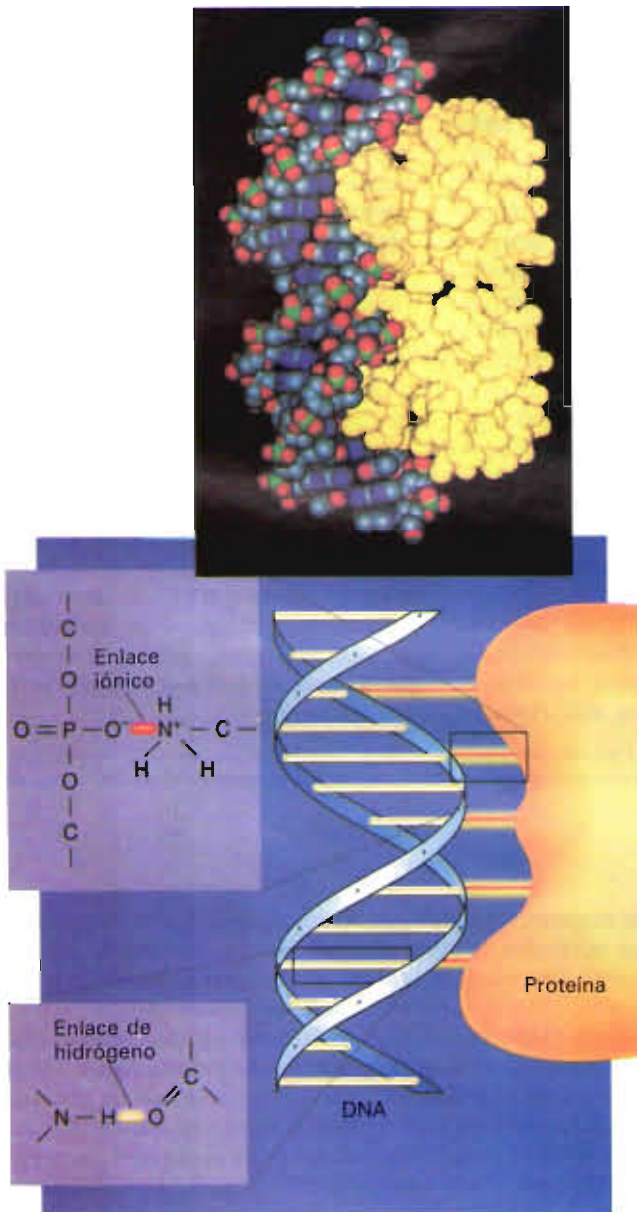


FIGURA 2-3. Los enlaces iónicos no covalentes desempeñan un papel importante para trasladar la molécula de proteína de la derecha (átomos amarillos) a la molécula de DNA de la izquierda. Los enlaces iónicos se forman entre átomos de nitrógeno con carga positiva en la proteína y los átomos de oxígeno con carga negativa en el DNA. La molécula de DNA en sí consta de dos cadenas separadas reunidas por enlaces de hidrógeno no covalentes (que analizaremos en la siguiente sección). Un solo enlace no covalente es relativamente débil y fácil de romper, pero, un gran número de estos enlaces entre dos moléculas, como entre dos cadenas de DNA, constituyen un complejo muy estable. (Fotografía cortesía de Stephen Harrison.)

aunque el átomo comparta por igual los electrones con algún otro átomo. Esta asimetría transitoria en la distribución de electrones da como resultado una separación momentánea de cargas (*dipolos*) entre la molécula. Si dos moléculas con dipolos transitorios se encuentran muy próximas entre

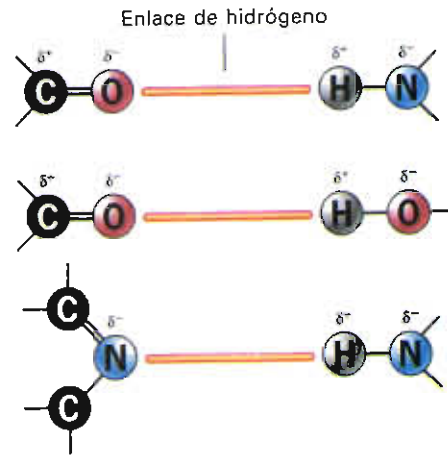


FIGURA 2-4. Enlaces de hidrógeno. Se forman entre un átomo electronegativo, como nitrógeno u oxígeno, que posee carga negativa parcial, y un átomo de hidrógeno con carga positiva parcial. Se muestran varios ejemplos de enlaces de hidrógeno.

sí y orientadas de la manera apropiada experimentan una fuerza de atracción denominada **fuerza de van der Waals**, que puede servir para unir las. Más aún, la separación transitoria de cargas en una molécula también puede *inducir* una separación similar de cargas en moléculas vecinas. Así

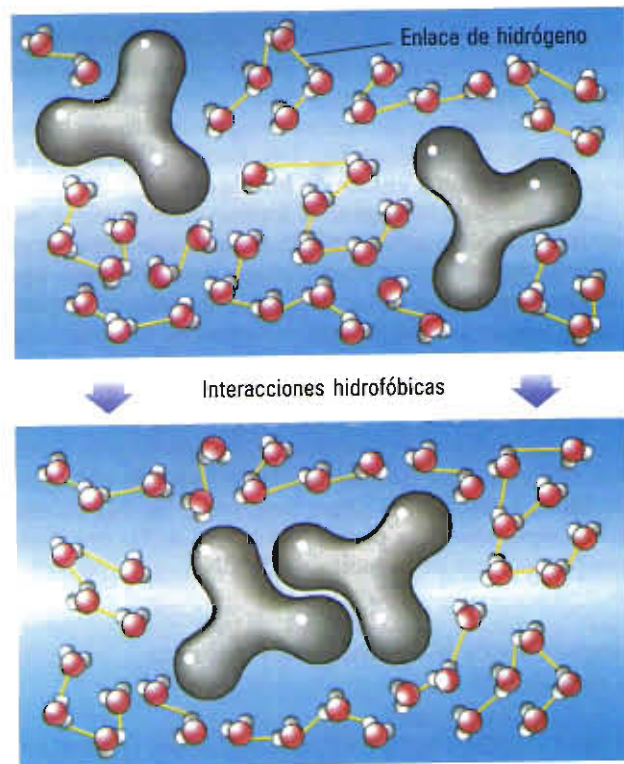


FIGURA 2-5. En una interacción hidrofóbica, las moléculas no polares (hidrofóbicas) se reúnen en agregados para reducir al mínimo su superficie expuesta a las moléculas de agua que las rodean.

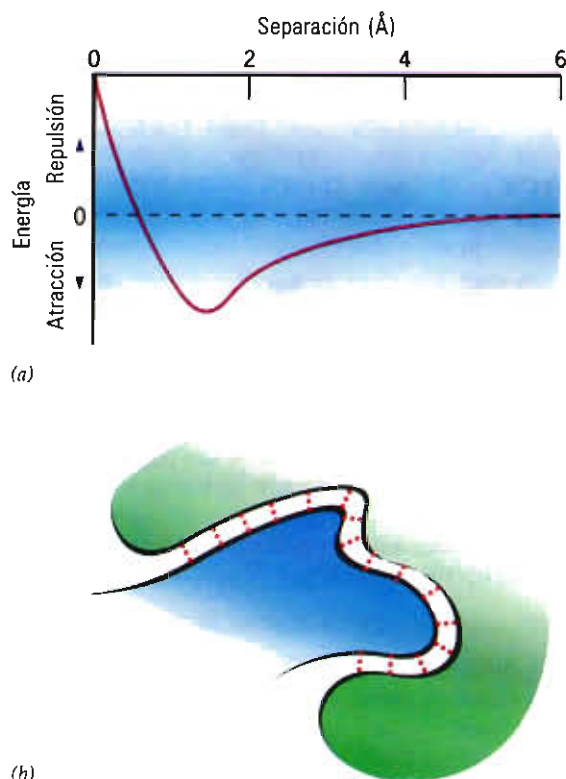


FIGURA 2-6. Fuerzas de van der Waals. *a)* Conforme se aproximan dos átomos, experimentan una débil fuerza de atracción que se incrementa hasta una distancia específica, generalmente cerca de 2 Å. Si los átomos se aproximan más, sus nubes electrónicas se rechazan entre sí y esto provoca la separación de los átomos. *b)* Aunque individualmente las fuerzas de van der Waals son muy débiles, se puede formar un gran número de dichas fuerzas de atracción cuando dos macromoléculas tienen una superficie complementaria, como se indica esquemáticamente en esta figura.

se pueden generar fuerzas adicionales de atracción entre moléculas no polares. Incluso en el instante de máxima fuerza de atracción, un solo enlace de van der Waals es muy débil (casi 1 kcal/mol) y muy sensible a la distancia que separa los dos átomos (fig. 2-6, *a*). Sin embargo, como veremos en los últimos capítulos, las moléculas biológicas que interactúan, por ejemplo, un anticuerpo y una proteína sobre la superficie de un virus, a menudo poseen formas complementarias entre sí. Como resultado, muchos átomos de las moléculas interactuantes tienen oportunidad de aproximarse muy cerca (fig. 2-6, *b*), y por lo tanto las fuerzas de van der Waals constituyen un factor importante en las interacciones biológicas.

Las propiedades del agua apoyan la vida

La vida sobre la tierra depende totalmente del agua y el agua puede ser indispensable para la existencia de vida en cualquier otro punto del universo. Aunque sólo contiene tres átomos, una molécula de agua tiene una estructura

única que confiere a esta molécula propiedades extraordinarias.² Entre las más importantes se hallan:

1. El agua es una molécula muy asimétrica con un átomo O en un lado y dos átomos H en el lado opuesto.
2. Cada uno de los dos enlaces covalentes de la molécula está altamente polarizado.
3. Los tres átomos de la molécula de agua pueden formar enlaces de hidrógeno.

Las propiedades de la molécula del agua que apoyan la vida se originan en estas características.

Cada molécula de agua puede formar enlaces de hidrógeno hasta con otras cuatro moléculas de agua, generando una red de moléculas íntimamente interconectadas (fig. 2-7). Cada enlace de hidrógeno se forma cuando el hidrógeno con carga parcialmente positiva de una molécula se alinea junto a un átomo de oxígeno con carga parcialmente negativa de otra molécula de agua. Debido a su gran número de enlaces de hidrógeno, las moléculas de agua tienden de manera inusitada a adherirse entre sí. Esta característica es más evidente al considerar las propiedades térmicas del agua. Por ejemplo, cuando se calienta agua, la mayor parte de la energía térmica se consume para romper enlaces de hidrógeno en vez de contribuir al movimiento de las moléculas (que se mide como incremento de temperatura). De manera similar, la evaporación desde el estado líquido al

² Una manera de apreciar la estructura del agua es compararla con H_2S . Igual que el oxígeno, el azufre tiene seis electrones en su capa externa y forma enlaces simples con dos átomos de hidrógeno. Pero el átomo de azufre es más grande y por lo tanto menos electronegativo que el oxígeno y su capacidad para formar enlaces de hidrógeno es muy reducida. A temperatura ambiente, el H_2S es un gas, no un líquido. En realidad, la temperatura debe descender a -86°C antes que el H_2S se congele para formar un sólido.

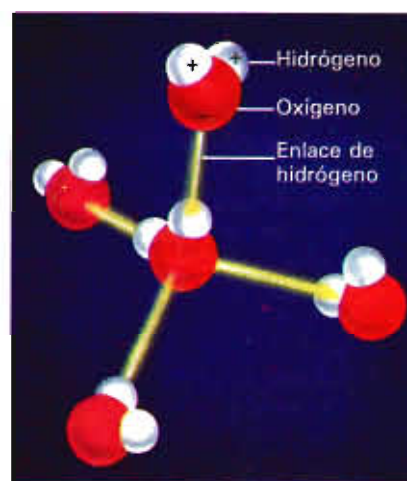


FIGURA 2-7. Formación de enlaces de hidrógeno entre moléculas de agua vecinas. La longitud de un enlace químico se relaciona con su fuerza, o sea, la energía necesaria para romperlo. El enlace de hidrógeno entre un átomo de H y un átomo de O es más largo que el enlace covalente entre un átomo de H y un átomo de O debido a que es un enlace mucho más débil.

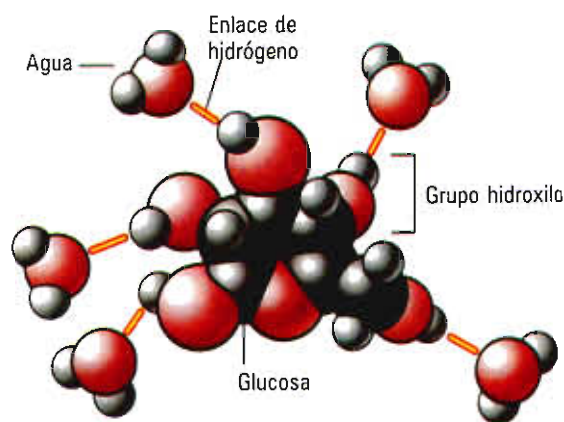


FIGURA 2-8. Vista esquemática de los tipos de enlace de hidrógeno que pueden formarse entre una molécula de azúcar y el agua en la cual se disuelve. Se muestran las moléculas de azúcar utilizando un modelo de espacio lleno, una manera común de representar la estructura de una molécula.

estado gaseoso requiere romper los enlaces de hidrógeno que mantienen unidas a las moléculas de agua con sus vecinas, y por esta razón se necesita tanta energía para convertir agua en vapor. Los mamíferos sacan provecho de esta propiedad cuando sudan, puesto que el calor requerido para evaporar el sudor se absorbe del cuerpo, que de esta manera se enfría.

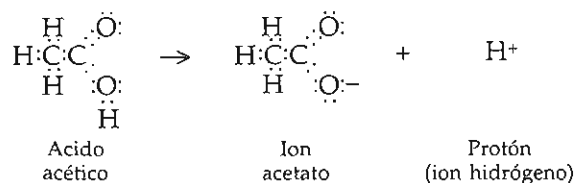
El pequeño volumen de agua líquida presente en una célula contiene una mezcla notablemente compleja de sustancias disueltas, o **solutos**. En realidad, el agua tiene capacidad para disolver numerosas sustancias, mayor que cualquier otro solvente. Pero el agua es mucho más que un simple solvente; es un factor determinante de la estructura de las moléculas biológicas y de los tipos de interacciones en las cuales pueden participar. El agua es el líquido matriz alrededor del cual se construye la estructura insoluble de la célula. También es el medio a través del cual los materiales se transportan de un compartimiento a otro de la célula; es reactante o producto en muchas reacciones celulares; protege a la célula de muchas maneras: del calor, del frío o de la radiación nociva excesivos.

El agua es un factor de tal importancia en la célula debido a su capacidad para formar interacciones débiles con múltiples tipos diferentes de grupos químicos. Recordemos, de la página 32, cómo las moléculas de agua, con sus enlaces O—H fuertemente polarizados, forman una capa alrededor de los iones y los separan entre sí. De manera similar, las moléculas de agua forman enlaces de hidrógeno con moléculas orgánicas, como azúcares y aminoácidos, que contienen grupos polares (fig. 2-8). Debido a su capacidad para formar enlaces débiles no covalentes con el agua, las moléculas polares tienden a separarse entre sí incrementando su solubilidad.

2-3 Ácidos, bases y amortiguadores

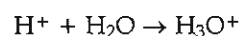
Los protones no sólo se encuentran dentro de los núcleos atómicos, sino que también se liberan al medio siempre que

un átomo de hidrógeno pierde un electrón. Consideremos el ácido acético, ingrediente característico del vinagre, que puede sufrir la siguiente reacción descrita como **disociación**.

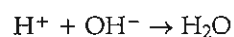


Una molécula capaz de liberar (donar) un ion hidrógeno se denomina **ácido**. El protón liberado por la molécula de ácido acético en la reacción previa no permanece en estado libre; se combina con otra molécula. Las posibles reacciones en las cuales participa un protón incluyen:

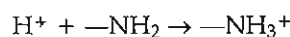
- Combinación con una molécula de agua para formar un ion hidrônio (H_3O^+).



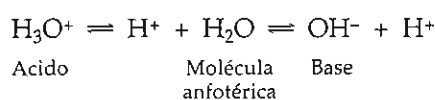
- Combinación con un ion hidroxilo (OH^-) para formar una molécula de agua.



- Combinación con un grupo amino ($-\text{NH}_2$) en una proteína para formar una amina con carga neta



Cualquier molécula capaz de aceptar un ion hidrógeno se define como una **base**. Los ácidos y las bases existen en pares, o *parejas*. Cuando el ácido pierde un protón (como cuando el ácido acético dona un ion hidrógeno), se forma una base (en este caso, ion acetato), denominada la *base conjugada* del ácido. De manera similar, cuando una base (como un grupo $-\text{NH}_2$) acepta un protón, se forma un ácido (en este caso $-\text{NH}_3^+$), el cual se denomina *ácido conjugado* de dicha base. Así, el ácido siempre contiene una carga positiva más que su base conjugada. El agua es ejemplo de una molécula *anfotérica*, o sea, aquella que puede servir como ácido o como base.*



En la página 51 analizaremos otro importante grupo de moléculas anfotéricas, los aminoácidos.

Los ácidos varían mucho respecto de la facilidad con la cual la molécula cede un protón. Cuanto más fácil se pierda el protón, o sea, cuanto menor sea la fuerza de atracción de la base conjugada por su protón, más fuerte es el ácido. El cloruro de hidrógeno es un ácido muy fuerte que transfiere con rapidez su protón a las moléculas de agua cuando se disuelve. La base conjugada de un ácido fuerte, como el HCl, es una base débil (cuadro 2-2). Por lo contrario, el ácido acético es un ácido relativamente débil porque en su mayor parte permanece sin disociarse cuando se disuelve en agua.

CUADRO 2-2. Fuerza de ácidos y bases

Ácidos		Bases	
Muy débil	H ₂ O	OH ⁻	Fuerte
Débil	NH ₄ ⁺	NH ₃	Débil
	H ₂ S	S ²⁻	
	CH ₃ COOH	CH ₃ COO ⁻	
	H ₂ CO ₃	HCO ₃ ⁻	
Fuerte	H ₃ O ⁺	H ₂ O	Muy débil
	HCl	Cl ⁻	
	H ₂ SO ₄	SO ₄ ²⁻	

Se puede considerar el grado de disociación de un ácido como la competencia por protones entre los componentes de una solución. El agua es un buen competidor, o sea, una base más fuerte en comparación con el ion cloro, de modo que el HCl se disocia por completo. Por lo contrario, el ion acetato es una base más fuerte que el agua y por lo tanto permanece principalmente sin disociarse.

La acidez de una solución se mide por la concentración de iones hidrógeno³ y se expresa en términos de pH.

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

Por ejemplo, una solución con pH de 5 tiene una concentración de iones hidrógeno de 10⁻⁵ M. Debido a que la escala es logarítmica, un incremento de una unidad de pH corresponde a un incremento de 10 veces la concentración de OH⁻ (o una disminución de 10 veces la concentración de H⁺). Por ejemplo, la concentración de H⁺ en el ácido del estómago es casi un millón de veces mayor que la concentración de este ion en la sangre.

Cuando una molécula de agua se disocia en un ion hidroxilo y un protón, H₂O → H⁺ + OH⁻ (o con mayor precisión, 2 H₂O → H₃O⁺ + OH⁻), la constante de equilibrio para la reacción se puede expresar como:

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{H}^+][\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]}$$

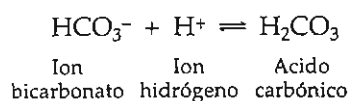
Puesto que la concentración de agua pura siempre es de 55.51 M, podemos generar una nueva constante, K_w, o *producto iónico constante* para el agua.

$$K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-]$$

igual a 10⁻¹⁴ a 25°C. La concentración de ambas especies en el agua pura es de aproximadamente 10⁻⁷ M. El grado sumamente bajo de disociación del agua indica que es un ácido muy débil. En presencia de un ácido, la concentración de iones hidrógeno se eleva y la concentración de iones hidroxilo desciende (como resultado de la combinación con

protones para formar agua), de modo que el producto iónico permanece en 10⁻¹⁴.

La mayor parte de los procesos biológicos son muy sensibles al pH debido a que los cambios en la concentración de ion hidrógeno afectan el estado iónico de las moléculas biológicas. Por ejemplo, conforme aumenta la concentración de ion hidrógeno, los grupos —NH₂ del aminoácido histidina se protonan para formar —NH₃⁺, que puede alterar la forma y actividad de toda proteína. Incluso cambios ligeros en pH pueden impedir reacciones biológicas. Los organismos, y las células que los forman, están protegidos de variaciones de pH por **amortiguadores**, compuestos que reaccionan con iones hidrógeno o hidroxilo libres, y por lo tanto resisten los cambios de pH. Las soluciones amortiguadoras de ordinario contienen un ácido débil junto con su base conjugada. Por ejemplo, la sangre está amortiguada por ácido carbónico y iones carbonato que normalmente mantienen el pH sanguíneo en una cifra cercana a 7.4.



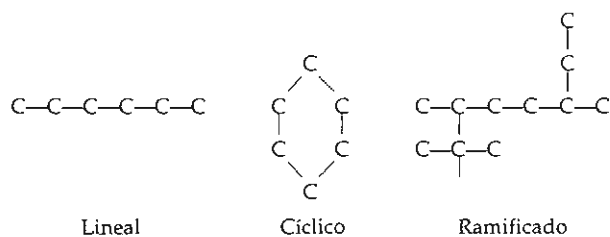
Si la concentración de ion hidrógeno se eleva (como ocurre durante el ejercicio), los iones bicarbonato se combinan con el exceso de protones y los eliminan de la solución. Inversamente, el exceso de iones OH⁻ (que se generan durante la hiperventilación) es neutralizado por protones derivados del ácido carbónico. El pH del líquido intracelular está regulado de manera similar por un sistema amortiguador de fosfatos que consiste en H₂PO₄⁻ y HPO₄²⁻.

2-4 Naturaleza de las moléculas biológicas

La masa de un organismo es agua. Si se evapora el agua, la mayor parte del *peso seco* consta de moléculas que contienen átomos de carbono. Cuando se descubrió esto se pensó que las moléculas que contienen carbono sólo estaban presentes en los organismos vivos y por lo tanto se les denominó *moléculas orgánicas*, para distinguirlas de las moléculas *inorgánicas* observadas en el mundo inanimado. Conforme los químicos aprendieron a sintetizar más y más moléculas compuestas de carbono en el laboratorio, se perdió la mística relacionada con los compuestos orgánicos. Los compuestos producidos por organismos vivientes se denominan **bioquímicos**.

La química de la vida se centra alrededor de la química del átomo de carbono. La cualidad esencial del carbono que le permite desempeñar este papel es el increíble número de moléculas que puede formar. El átomo de carbono posee cuatro electrones en su capa externa y por lo tanto puede enlazarse a otros cuatro átomos (véase fig. 2-1). Además, cada átomo de carbono puede formar enlaces con otros átomos de carbono y de esta manera construir moléculas con esqueletos que contienen largas cadenas de átomos de carbono. Los esqueletos de carbono pueden ser lineales, ramificados o cíclicos.

³ En solución acuosa los protones no existen en estado libre, sino más bien como iones hidronio (H₃O⁺). En aras de la sencillez, nos referimos a ellos simplemente como protones o iones hidrógeno.

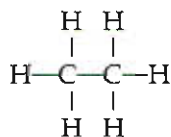


El colesterol, cuya estructura se muestra en la figura 2-9, ilustra varios arreglos de átomos de carbono.

Tanto el tamaño como la estructura electrónica del carbono le confieren características particularmente adecuadas para generar numerosas moléculas, de las cuales se conocen varios cientos de miles. En contraste, el silicio, que se encuentra justo por debajo del carbono en la tabla periódica y que también posee cuatro electrones en su capa externa (véase fig. 2-1), es demasiado grande para que la carga positiva de su núcleo atraiga electrones de la capa externa de los átomos vecinos con fuerza suficiente para mantener unida la estructura de moléculas grandes.

Hidrocarburos

Podemos entender la naturaleza de las moléculas biológicas iniciando el estudio con el grupo más simple de moléculas orgánicas, los *hidrocarburos*, que sólo contienen átomos de carbono y de hidrógeno. La molécula de etano (C_2H_6) es un hidrocarburo simple que consta de dos átomos de carbono unidos entre sí y además tres átomos de hidrógeno.



Colesterol

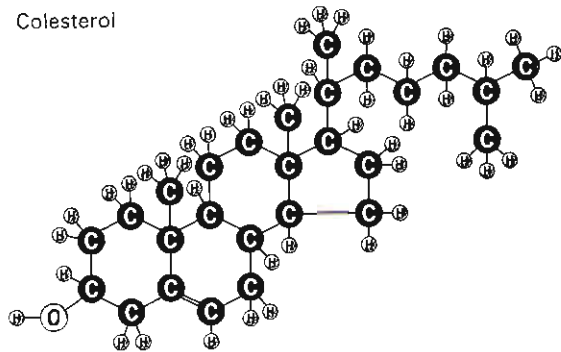
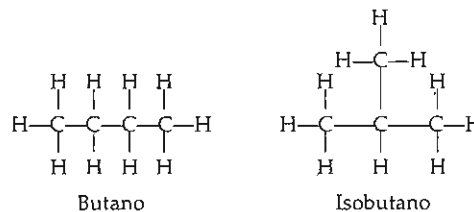


FIGURA 2-9. El colesterol, cuya estructura ilustra cómo los átomos de carbono (representados por esferas negras) pueden formar enlaces covalentes hasta con otros cuatro átomos de carbono. Como resultado, los átomos de carbono se pueden unir entre sí para formar esqueletos de un número prácticamente ilimitado de moléculas orgánicas. El esqueleto de carbono de una molécula de colesterol incluye cuatro anillos, característica de los esteroides (p. ej., estrógenos, testosterona, cortisol). La molécula de colesterol se muestra aquí como un modelo de esferas y palitos, otra manera de mostrar la estructura molecular.

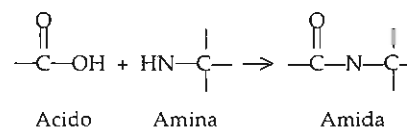
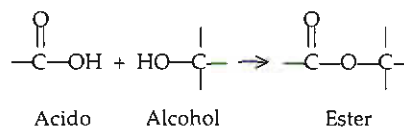
Conforme se añaden más átomos de carbono, el esqueleto de las moléculas orgánicas aumenta de longitud y su estructura es cada vez más compleja. Un hidrocarburo con la fórmula C_4H_{10} puede existir con dos moléculas diferentes



Estas moléculas tienen propiedades diferentes como resultado de la manera de unirse los diferentes átomos entre sí. Dos moléculas que tienen la misma fórmula (p. ej., C_4H_{10}) pero estructuras diferentes se dice que son *isómeros estructurales* entre sí. Las moléculas constituidas por un mayor número de átomos tienen un número cada vez mayor de isómeros estructurales.

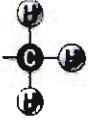
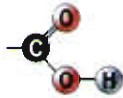
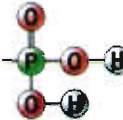
Grupos funcionales

Los hidrocarburos no se encuentran en cantidad significativa en la mayor parte de las células vivas (aunque constituyen la masa de los combustibles fósiles formados a partir de los restos de plantas y animales antiguos). Las moléculas orgánicas de importancia biológica contienen cadenas de átomos de carbono, como los hidrocarburos, pero en las cuales ciertos átomos de hidrógeno son sustituidos por diferentes grupos funcionales. Los **grupos funcionales** son agrupamientos particulares de átomos que casi siempre se comportan como una unidad y confieren a las moléculas orgánicas sus propiedades físicas, reactividad química y solubilidad en solución acuosa. En el cuadro 2-3 se presenta una lista de los grupos funcionales más comunes. Dos de las uniones más frecuentes entre grupos funcionales son los **enlaces éster**, los cuales se forman entre ácidos carboxílicos y alcoholes, y los **enlaces amido**, formados entre ácidos carboxílicos y aminas.



La mayor parte de los grupos del cuadro 2-3 contiene uno o más átomos electronegativos (N, P, O o S) y está constituido por moléculas orgánicas más polares, más solubles en agua y más reactivas. Muchos de los grupos funcionales pueden ionizarse y por lo tanto convertirse en partículas con carga negativa o positiva. Se puede demostrar fácilmente el efecto de sustituir varios grupos funcionales.

CUADRO 2-3. Grupos funcionales

						
Metilo	Hidroxilo	Carboxilo	Amino	Fosfato	Carbonilo	Sulfhidrilo

El hidrocarburo etano (CH_3CH_3) es un gas inflamable tóxico. Si se sustituye uno de los hidrógenos con un grupo hidroxilo ($-\text{OH}$), la molécula resultante ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) se convierte en algo agradable al paladar, o sea alcohol etílico. Si se sustituye un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) la molécula se convierte en ácido acético (CH_3COOH), mejor conocido como vinagre. Si se sustituye un grupo sulfhidrilo ($-\text{SH}$) se obtiene $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SH}$, compuesto de olor fétido intenso, el erilmercaptano, empleado por los bioquímicos en el estudio de reacciones enzimáticas.

Clasificación de las moléculas biológicas según su función

Las moléculas orgánicas comúnmente observadas dentro de las células vivas se pueden dividir en varias categorías, según su papel en el metabolismo.

1. Macromoléculas. Las moléculas que forman la estructura y ejecutan las actividades de las células son moléculas grandes, altamente organizadas, llamadas **macromoléculas**, que en todos los casos contienen docenas a millones de átomos de carbono. Debido a su tamaño y a las intrincadas formas que las macromoléculas pueden adoptar, algunas de estas gigantescas moléculas pueden ejecutar tareas complejas con gran precisión y eficiencia. La presencia de macromoléculas, más que cualquier otra característica, confiere a los organismos las propiedades de la vida y las singulariza químicamente dentro del mundo inanimado.

Las macromoléculas se pueden dividir en cuatro categorías principales: proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos. Los primeros tres tipos son *polímeros* compuestos de gran número de elementos de bajo peso molecular o *monómeros*. Estas macromoléculas se construyen a partir de monómeros mediante un proceso que recuerda el acoplamiento de vagones de ferrocarril (fig. 2-10). La estructura básica y función de cada familia de macromoléculas es muy similar en todos los organismos, desde bacterias hasta el ser humano. Hay que observar con atención las secuencias específicas de los monómeros que constituyen las diferentes macromoléculas para apreciar la diversidad entre los organismos.

2. Elementos unitarios para construir macromoléculas. Dentro de una célula, la mayor parte de las macromoléculas tienen un periodo de vida breve en comparación con la propia célula; con excepción del DNA celular, las macromoléculas se rompen y sustituyen continuamente por nue-

vas macromoléculas. En consecuencia, casi todas las células contienen un almacén (o *fondo común*) de precursores de bajo peso molecular listos para incorporarse a las macromoléculas. Estos incluyen azúcares, precursores de polisacáridos; aminoácidos, precursores de proteínas; nucleótidos, precursores de ácidos nucleicos, y ácidos grasos que se incorporan a lípidos.

3. Intermediarios metabólicos (metabolitos). Las moléculas empleadas por una célula poseen una estructura química compleja y deben sintetizarse paso a paso en secuencias iniciadas con materias primas específicas. Cada serie de reacciones químicas dentro de la célula se denomina **vía metabólica**. La célula convierte un compuesto A en un compuesto B, luego en un compuesto C, y así sucesivamente, hasta formar algún tipo de producto final que la propia célula puede utilizar (por ejemplo un aminoácido para construir una proteína). Los compuestos formados a lo largo de las vías metabólicas pueden generar productos que no tienen por sí mismos una función y a los cuales se les denomina **intermediarios metabólicos**.

4. Moléculas con diversas funciones. Evidentemente, ésta es una categoría muy amplia de moléculas, pero no tan grande como se podría esperar; gran parte de la masa del peso seco de una célula está formada de macromoléculas y sus precursores directos. Las moléculas de función diversa incluyen sustancias como vitaminas, cuya función primaria es la de coadyuvantes de proteínas; ciertas hormonas esteroideas o aminoácidos; moléculas que participan en el almacenamiento de energía, como ATP o fosfato de creatina; moléculas reguladoras como el AMP cíclico, y productos de desperdicio metabólico como la urea.

2-5 Cuatro familias de moléculas biológicas

Las moléculas descritas antes se pueden dividir en cuatro clases o familias de moléculas orgánicas: carbohidratos, lípidos, aminoácidos y proteínas, y nucleótidos y ácidos nucleicos.

Carbohidratos

Los carbohidratos son un grupo de sustancias que incluyen azúcares simples (o *monosacáridos*) y todas las moléculas más grandes construidas con bloques de azúcares. La principal función de los carbohidratos es almacenar energía

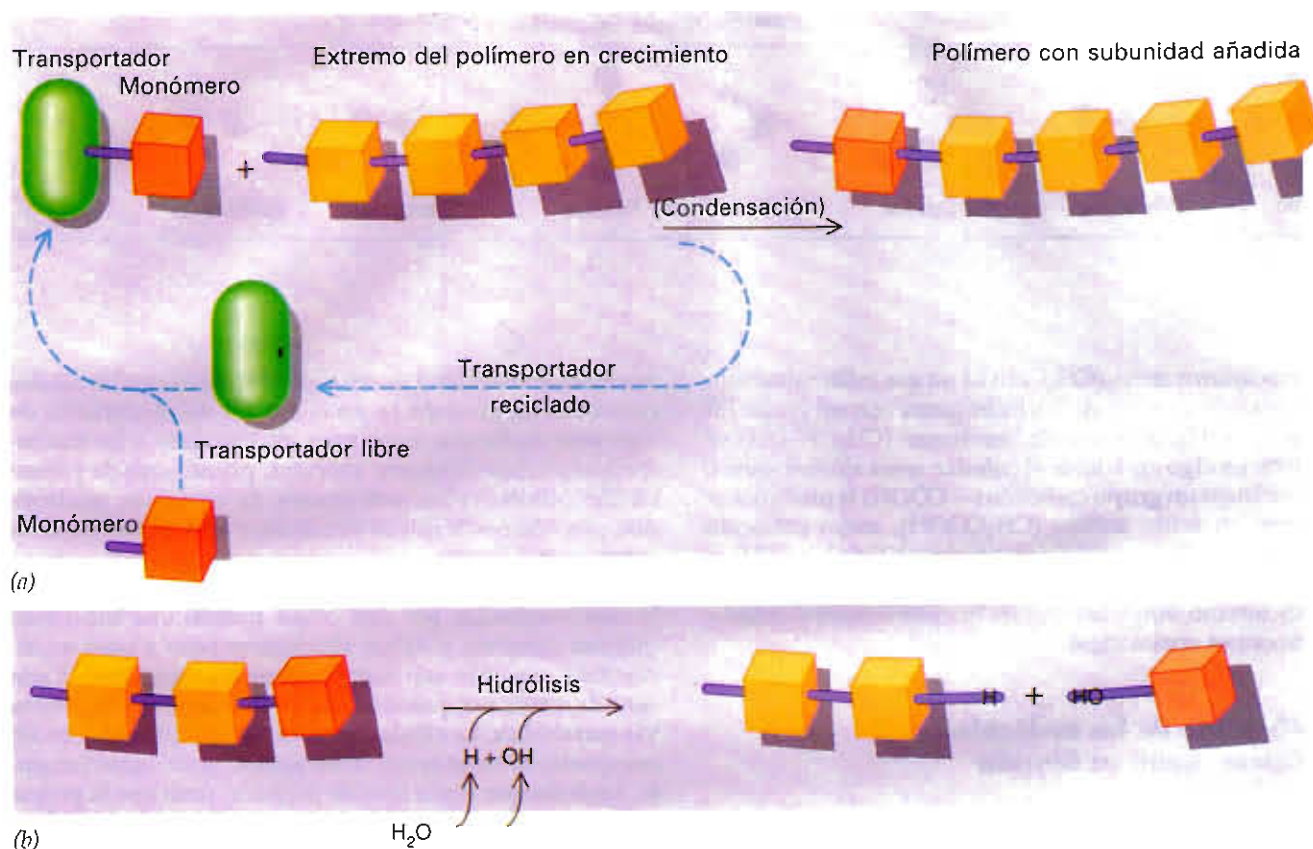


FIGURA 2-10. Monómeros y polímeros. a) Los polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos constan de monómeros (subunidades) unidos por enlaces covalentes. Los monómeros libres no reaccionan entre sí para convertirse en macromoléculas. Más bien, cada monómero primero debe activarse fijándose a una molécula transportadora que luego transfiere el monómero al extremo de la macromolécula en crecimiento. b) Una macromolécula se puede descomponer mediante hidrólisis de los enlaces que juntan a los monómeros. Hidrólisis es la separación de un enlace por una molécula de agua. Todas estas reacciones son catalizadas por enzimas específicas.

química y como material de construcción durable para estructuras biológicas. Casi todos los azúcares tienen la fórmula general $(CH_2O)_n$. Los valores de n para los azúcares importantes en el metabolismo celular varían de 3 a 7. Los azúcares con tres carbonos se conocen como *triosas*; los de cuatro carbonos como *tetrosas*; los de cinco carbonos como *pentosas*; los de seis, *hexosas*, y los de siete, *heptosas*.

Estructura de los azúcares simples

Cada molécula de azúcar contiene un esqueleto de átomos de carbono unidos en disposición lineal mediante enlaces sencillos. Cada átomo de carbono del esqueleto se une a un solo grupo hidroxilo, excepto los que poseen un grupo carbonilo ($C=O$). Si el grupo carbonilo se localiza en una posición interna (forma un grupo cetona), el azúcar es una *cetosa*, como la fructuosa mostrada en la figura 2-11, a. Si el carbonilo se localiza en un extremo del azúcar, forma un grupo aldehído y la molécula se conoce como una *aldosa*, según se ejemplifica con la glucosa, que se muestra en la figura 2-11, b-f. Aunque las fórmulas de cadena recta mostradas en la figura 2-11, a,b, son útiles para comparar las estructuras de varios azúcares, no reflejan el hecho de que los azúcares con cinco o más átomos de carbono sufran una

autorreacción (fig. 2-11, c) que las convierte en moléculas cerradas o con un anillo. Los azúcares con anillos de ordinario se representan como estructuras planas (*planares*) (fig. 2-11, d) situadas perpendicularmente al plano del papel con la línea gruesa situada más cerca del lector. Los grupos H y OH se ubican en el plano del papel proyectándose hacia arriba o hacia abajo del anillo del azúcar. En realidad, el anillo del azúcar no es una estructura planar, sino que casi siempre existe en una conformación tridimensional que recuerda una silla (fig. 2-11, e,f).

Estereoisomerismo

Como se mencionó antes, un átomo de carbono puede formar uniones simples con otros cuatro átomos. La disposición de los grupos alrededor del átomo de carbono se puede representar como en la figura 2-12, a, con el carbono colocado en el centro de un tetraedro y los grupos enlazados proyectándose en sus cuatro esquinas. La figura 2-12, b, muestra una molécula de gliceraldehído, la única aldotriosa. El segundo átomo de carbono del gliceraldehído se une a cuatro grupos diferentes ($-H$, $-OH$, $-CHO$ y $-CH_2OH$). Si los cuatro grupos enlazados a un átomo de carbono son todos diferentes, como en el gliceraldehído, entonces exis-

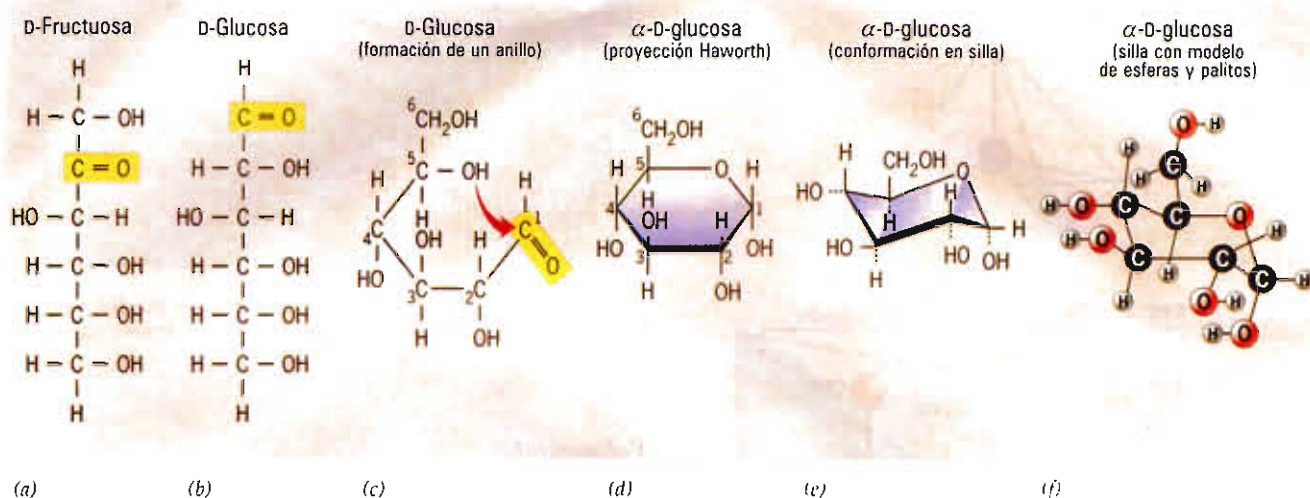


FIGURA 2-11. Estructuras de los azúcares. *a)* La fórmula de cadena recta de la fructosa, una cetohehexosa [ceto indica el carbonilo (amarillo) localizado internamente y hexosa debido a que contiene seis carbonos]. *b)* Fórmula de cadena recta de la glucosa, una aldohexosa (aldo porque el carbonilo se localiza al final de la molécula). *c)* Autorreacción en la cual la glucosa se convierte de cadena abierta en un anillo cerrado (anillo de piranosa). *d)* La glucosa comúnmente se muestra en forma de anillo plano (planar) con la línea gruesa situada más próxima al lector y los grupos H y OH proyectándose hacia arriba o hacia abajo del anillo. Las bases de la designación α -D-glucosa se analizan en la siguiente sección. *e)* Conformación de la glucosa en silla, que muestra su estructura tridimensional con mayor precisión que el anillo plano del inciso *d*. *f)* Modelo de esferas y varillas de la glucosa en conformación de silla, mostrando la posición de los diferentes átomos de la molécula.

ten dos posibles configuraciones que no pueden superponerse. Estas dos moléculas (llamadas *estereoisómeros* o *enantiómeros*) tienen prácticamente la misma reactividad química, pero estructuralmente son imágenes en espejo entre sí. Por convención, la molécula se llama D-gliceraldehído si el grupo hidroxilo del carbono 2 se proyecta a la derecha y L-gliceraldehído si se proyecta a la izquierda (fig. 2-12, *c*). Debido a que actúa como sitio de estereoisomerismo, el carbono 2 se denomina átomo de carbono *asimétrico*.

Conforme el esqueleto de las moléculas de azúcar aumenta de longitud, ocurre lo mismo con el número de átomos de carbono asimétrico y, por consiguiente, con el número de isómeros. Las aldotetrosas tienen dos carbonos asimétricos y por lo tanto pueden existir en cuatro configuraciones diferentes (fig. 2-13). De manera similar, hay ocho aldopentosas diferentes y 16 aldohexosas distintas. La designación de cada uno de estos azúcares como D o L se basa por convención en la disposición de los grupos unidos al átomo de carbono asimétrico más alejado del aldehído, al cual se designa C1. Si el grupo hidroxilo de este carbono se proyecta a la derecha, la aldosa es un D-azúcar; si se proyecta a la izquierda es un L-azúcar. Las enzimas presentes en las células vivas pueden distinguir entre las formas D y L de un azúcar. En condiciones típicas, sólo uno de los estereoisómeros (como la D-glucosa y la L-fucosa) es utilizado por las células.

En la figura 2-11, *c*, se muestra la autorreacción mediante la cual una molécula de glucosa de cadena recta se convierte en un anillo de seis miembros (*piranosa*). A diferencia de su precursor de cadena abierta, el C1 del anillo posee cuatro grupos diferentes y por lo tanto se convierte en nuevo centro de asimetría dentro de la molécula del azúcar. Debido a este átomo extra de carbono asimétrico,

cada tipo de piranosa existe como estereoisómero α y β (fig. 2-14). Por convención, la molécula es una α -piranosa cuando el grupo OH del primer carbono se proyecta por debajo del plano del anillo y una β -piranosa cuando el grupo hidroxilo se proyecta hacia arriba. La diferencia entre las dos formas tiene consecuencias biológicas importantes; por ejemplo, explica la forma compacta de las moléculas de glucógeno y almidón, y la conformación extendida de la celulosa (que analizaremos más adelante).

Unión de azúcares entre sí

Los azúcares se unen entre sí mediante **enlaces glucosídicos** covalentes para formar moléculas más grandes. Estos enlaces se forman por una reacción entre el átomo de carbono C1 de un azúcar y el grupo hidroxilo de otro azúcar, generando un enlace —C—O—C— entre los dos azúcares (como en la figura 2-15). Las moléculas compuestas sólo de dos unidades de azúcar, como las mostradas en la figura 2-15, son **disacáridos**. Los disacáridos sirven principalmente como almacén de energía rápidamente disponible. La sucrosa, o azúcar de mesa, es uno de los principales componentes de la savia de las plantas y lleva energía química de una parte de la planta a otra. La lactosa, presente en la leche de la mayor parte de los mamíferos, suministra a los mamíferos recién nacidos el combustible para su crecimiento y desarrollo inicial. La lactosa de la dieta se hidroliza mediante una enzima lactasa, presente en la membrana plasmática de las células que revisten el intestino. Muchas personas pierden esta enzima después de la infancia y se dan cuenta que la ingestión de productos lácteos, que contienen lactosa, les causa malestar digestivo.

Los azúcares también se pueden unir para formar cadenas más pequeñas llamadas **oligosacáridos** (*oligo* = esca-

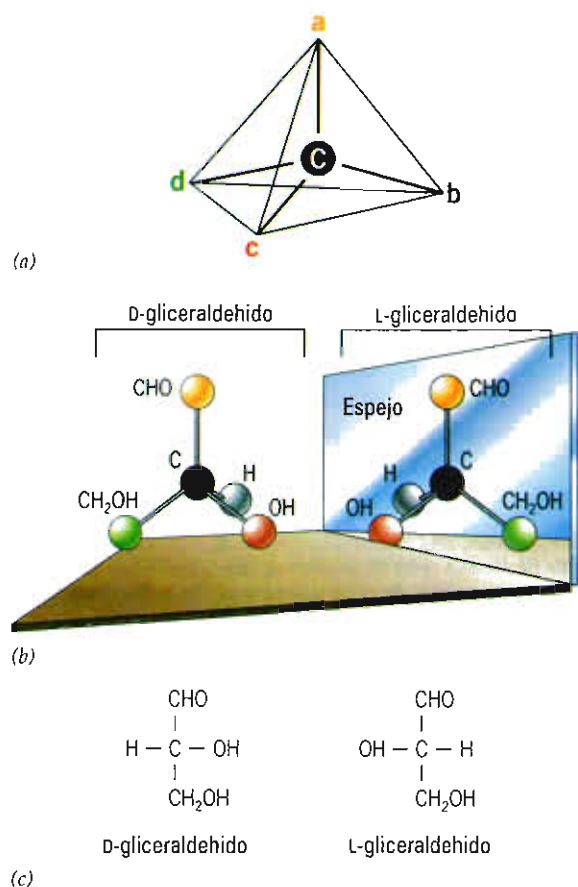


FIGURA 2-12. Estereoisomerismo del gliceraldehído. a) Los cuatro grupos unidos al átomo de carbono (marcados a, b, c, y d) ocupan las cuatro aristas de un tetraedro que tiene un átomo de carbono en su centro. b) El gliceraldehído es la única aldosa de tres carbonos: su segundo átomo de carbono se enlaza a cuatro grupos diferentes (—H , —OH , —CHO y $\text{—CH}_2\text{OH}$). Como resultado, el gliceraldehído puede existir en dos configuraciones posibles que no se pueden superponer entre sí, más bien son imágenes en espejo, como se indica en la figura. Estos dos estereoisómeros (o enantiómeros) se pueden distinguir por la configuración de los cuatro grupos que rodean al átomo de carbono asimétrico (o *quiral*). Las soluciones de estos dos isómeros giran el plano de luz polarizada en direcciones opuestas y por lo tanto se dice que son “ópticamente activos”. c) Fórmulas de cadena recta del gliceraldehído. Por convención, se muestra el D-isómero con el átomo OH a la derecha.

so). Casi siempre estas cadenas se unen mediante enlaces covalentes a lípidos y proteínas convirtiéndolos en glucolípidos y glucoproteínas, respectivamente. Los oligosacáridos son de particular importancia como glucolípidos y glucoproteínas de la membrana plasmática donde se proyectan por encima de la superficie celular (véase fig. 4-15). Puesto que los oligosacáridos se componen de muchas unidades de azúcar en combinaciones diferentes, estos carbohidratos pueden desempeñar un papel informativo, o sea, pueden servir para distinguir un tipo de célula de otro y ayudar a mediar interacciones específicas de una célula con sus vecinos (sección 7-1).

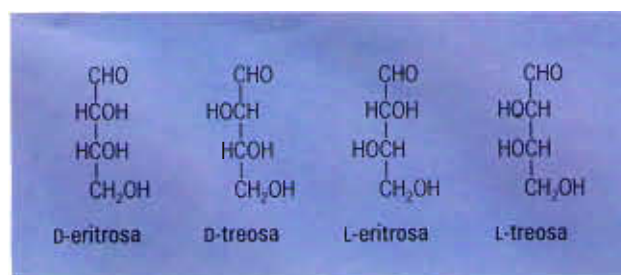


FIGURA 2-13. Aldotetrosas. Las aldotetrosas pueden existir en cuatro configuraciones debido a que poseen dos átomos de carbono asimétricos.

Polisacáridos

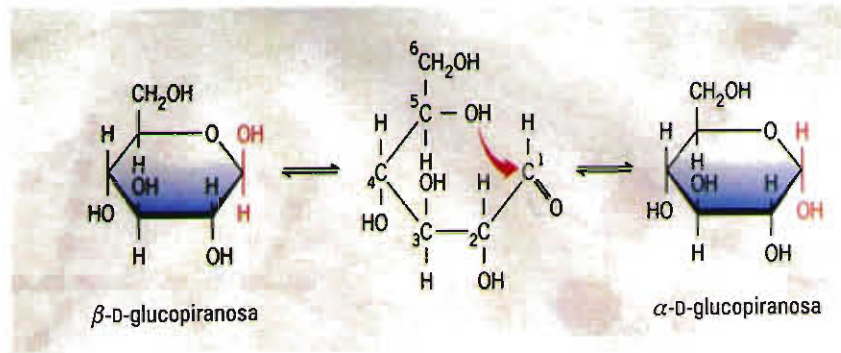
A mediados del siglo XIX se descubrió que la sangre de las personas que sufrían diabetes tenía sabor dulce debido a una elevada concentración de glucosa, el azúcar clave del metabolismo energético. Claude Bernard, prominente fisiólogo francés de esa época, estudió la causa de la diabetes investigando la fuente del azúcar sanguíneo. En aquella época se asumía que todo azúcar presente en la sangre de un ser humano o de un animal debía haberse consumido previamente en la dieta. Trabajando con perros, Bernard encontró que aun si los animales consumían una dieta totalmente carente de carbohidratos, su sangre todavía contenía una cantidad normal de glucosa. Claramente, la glucosa podía formarse en el cuerpo a partir de otros tipos de compuestos.

Después de nuevas investigaciones, Bernard encontró que la glucosa penetra a la sangre procedente del hígado. Observó que el tejido hepático contiene un polímero insoluble de la glucosa al que llamó **glucógeno**. Bernard concluyó que varios materiales nutrientes (como las proteínas) llegaban al hígado donde químicamente eran convertidas en glucosa y se almacenaban como glucógeno. A continuación, conforme el cuerpo necesitaba azúcar como combustible, el glucógeno del hígado se transformaba en glucosa y se liberaba al torrente sanguíneo para satisfacer las necesidades de glucosa de los tejidos con depleción. En la hipótesis de Bernard, el equilibrio entre la formación y la descomposición de glucógeno en el hígado era el principal factor determinante para mantener la concentración relativamente constante (homeostática) de glucosa en la sangre.

La hipótesis de Bernard era correcta. La molécula a la cual llamó glucógeno es un tipo de **polisacárido**: un polímero de unidades de azúcar juntas mediante enlaces glucosídicos.

Glucógeno y almidón: polisacáridos nutricionales. El glucógeno es un polímero que sólo contiene un tipo de monómero: la glucosa (fig. 2-16, a). Casi todas las unidades de azúcar de una molécula de glucógeno están unidas entre sí mediante enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$ (enlace tipo 2 en la figura 2-16, a). Más o menos cada 10 unidades de azúcar hay puntos de ramificación; cada punto de ramificación contiene un azúcar unido a tres unidades vecinas en vez de dos, como en los segmentos no ramificados del polímero. El vecino extra, que forma la rama, está unido mediante un enlace glucosídico $\alpha(1\rightarrow6)$ (enlace tipo 1 en la figura 2-16, a).

FIGURA 2-14. Formación de una piranosa α y una β . Cuando una molécula de glucosa sufre una autorreacción para formar un anillo de piranosa (o sea un anillo de seis miembros), se generan dos estereoisómeros. Los dos isómeros están en equilibrio a través de la forma de cadena abierta de la molécula. Por convención, la molécula es una piranosa α cuando el grupo OH del primer carbono se proyecta por debajo del plano del anillo y una piranosa β cuando el grupo hidroxilo se proyecta hacia arriba.



En la mayor parte de los animales, el glucógeno sirve como almacén del exceso de energía química; por ejemplo, el músculo esquelético del ser humano por lo general contiene suficiente glucógeno para sostener una actividad moderada durante casi 30 minutos. En condiciones típicas y dependiendo de varios factores, el peso molecular del glucógeno varía de uno a cuatro millones de daltons. El glucógeno se almacena en las células en forma muy concentrada; se observa como gránulos irregulares teñidos de color oscuro en las micrografías electrónicas (fig. 2-16, *a*, lado derecho).

La mayor parte de las plantas almacenan su excedente de energía química en forma de **almidón**, un polímero de la

glucosa igual que el glucógeno. Las patatas y los cereales, por ejemplo, contienen principalmente almidón. En realidad, el almidón es una mezcla de dos polímeros diferentes, amilosa y amilopectina. La amilosa es una molécula helicoidal no ramificada cuyos azúcares están unidos por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ (fig. 2-16, *b*), en tanto que la amilopectina es ramificada. La amilopectina difiere del glucógeno por ser mucho menos ramificada y con peso molecular total también mucho más bajo (unos 500 000 daltons). El almidón se almacena en forma de granos incluidos en la membrana que rodea los organelos (*plásmidos*) dentro de la célula vegetal (fig. 2-16, *b*, lado derecho). Aunque los animales no sintetizan almidón, poseen una enzima (*amilasa*) que hidroliza rápidamente las moléculas de almidón.

Celulosa, quitina y glucosaminglicanos: polisacáridos estructurales. Algunos polisacáridos constituyen almacenes de energía fácilmente digerible, en tanto que otros forman materiales estructurales resistentes y durables. El algodón y el lino, por ejemplo, constan sobre todo de **celulosa**, un polisacárido estructural que constituye el principal componente de la pared de las células vegetales. Las telas de algodón deben su durabilidad a moléculas de celulosa no ramificadas y largas que se ordenan en agregados lado con lado para formar cordones moleculares (lado derecho de la figura 2-16, *c*), idealmente contruidos para resistir fuerzas de tensión (ténsiles). Igual que el glucógeno y el almidón, la celulosa sólo contiene monómeros de glucosa; sus propiedades difieren de manera espectacular de las de otros polisacáridos debido a que las unidades de glucosa están unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ (enlace 3 en la figura 2-16, *c*) en vez de enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$. Irónicamente, los animales multicelulares (con raras excepciones) carecen de la enzima necesaria para descomponer la celulosa, que es el material orgánico más abundante sobre la tierra y rico en energía química. Los animales que “pueden vivir” digiriendo celulosa, como las termitas y las ovejas, pueden hacerlo porque albergan bacterias y protozoarios (fig. 2-17) que sintetizan la enzima necesaria, celulosa.

No todos los polisacáridos biológicos contienen monómeros de glucosa. La **quitina** es un polímero no ramificado del azúcar *N*-acetilglucosamina, similar en estructura a la glucosa, pero que tiene un grupo acetilamina en vez de un grupo hidroxilo enlazado al segundo átomo del anillo.

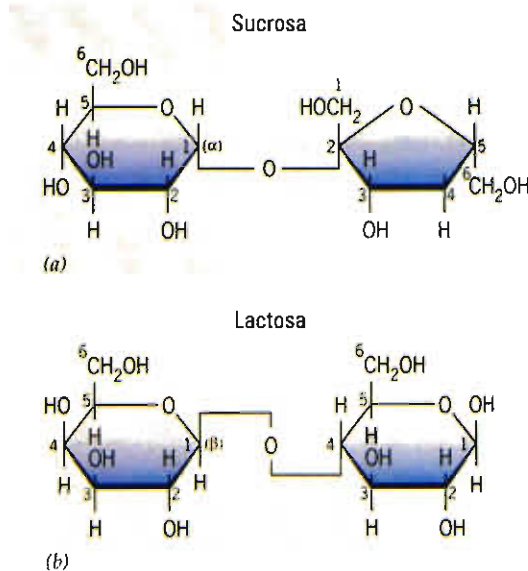


FIGURA 2-15. Disacáridos. Sucrosa y lactosa son dos de los disacáridos más comunes. La sucrosa se compone de glucosa y fructosa juntas por una unión $\alpha(1\rightarrow2)$, en tanto que la lactosa se compone de glucosa y galactosa juntas por una unión $\beta(1\rightarrow4)$. Estos disacáridos no se forman en la célula por reacción simple, sino que requieren la transferencia de uno de los azúcares a partir de un transportador (específicamente un azúcar nucleótido, como la UDP-glucosa o la UDP-galactosa).

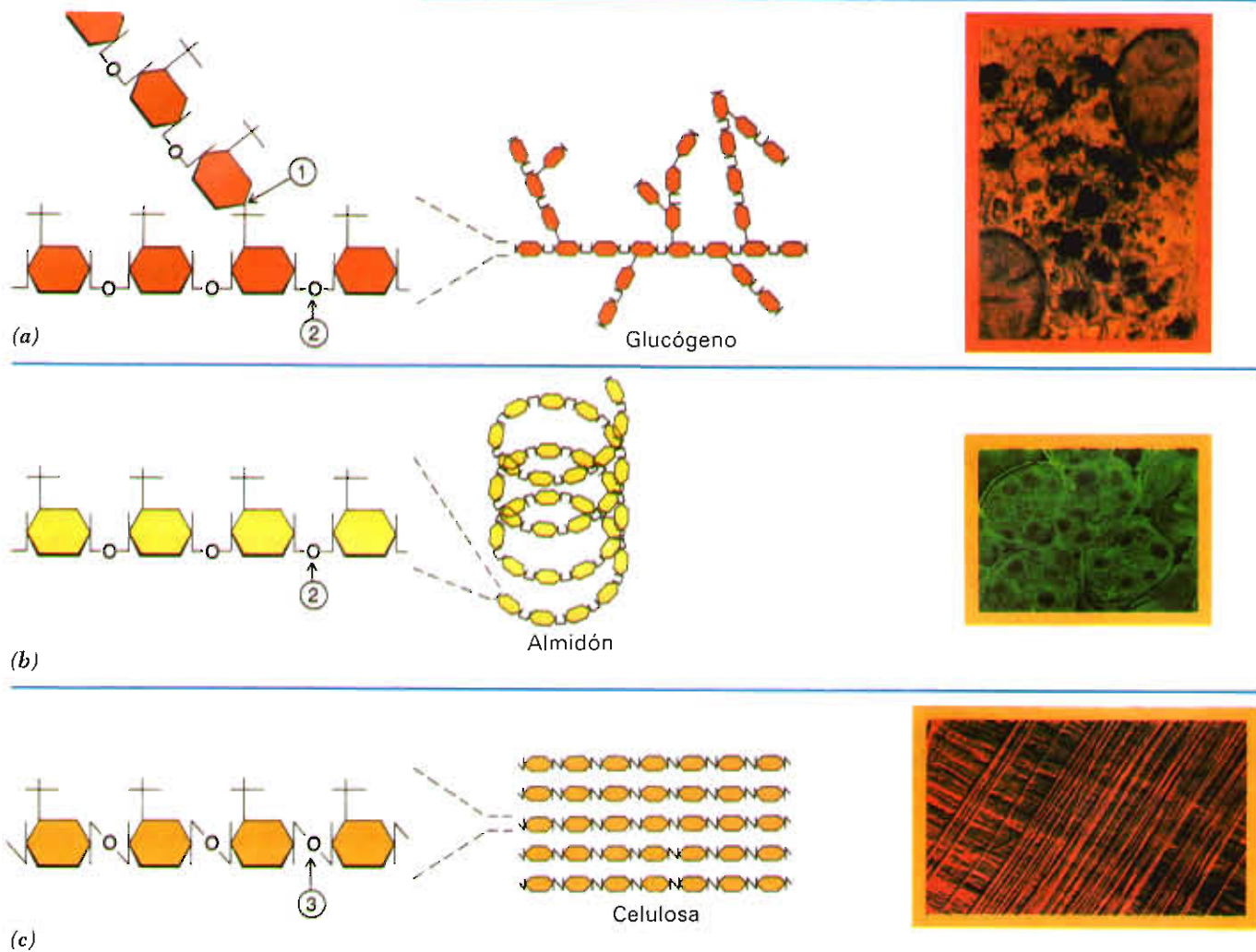
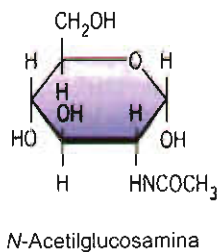


FIGURA 2-16. Tres polisacáridos con idénticos monómeros de azúcar, pero con propiedades espectacularmente diferentes. Glucógeno (a), almidón (b) y celulosa (c), cada uno compuesto totalmente de subunidades de glucosa, pero sus propiedades físicas y químicas son muy diferentes debido a las distintas formas en que los monómeros se unen (los números dentro de los círculos indican tres tipos diferentes de uniones). Las moléculas de glucógeno son las más ampliamente ramificadas, las moléculas de almidón adoptan disposición helicoidal y las de celulosa no están ramificadas, pero sí muy extendidas. El glucógeno y el almidón son almacenes de energía, en tanto que las moléculas de celulosa se unen formando haces apretados de fibras adecuados para su papel estructural. Las micrografías electrónicas muestran gránulos de glucógeno en una célula hepática, granos de almidón (amiloplastos) en una semilla vegetal y fibras de celulosa en la pared de una célula vegetal. (Fotografías de los recuadros: arriba, Don Fawcett/Visuals Unlimited; centro, Jeremy Burgess/Photo Researchers; abajo, Cabisco/Visuals Unlimited.)



La quitina es un material estructural ampliamente distribuido entre los invertebrados, particularmente en la cubier-

ta externa de insectos, arañas y crustáceos. Es correosa, resistente pero flexible, no muy diferente a ciertos plásticos. Los insectos deben gran parte de su éxito a este polisacárido altamente adaptable que los cubre (fig. 2-18).

Otro grupo de polisacáridos con una estructura más compleja son los **glucosaminglicanos** (o GAG). A diferencia de otros polisacáridos, poseen la estructura —A—B—A—B—, donde A y B representan dos azúcares diferentes. Estos polisacáridos se encuentran principalmente en los espacios que rodean la célula, y su estructura y función serán consideradas con mayor detalle en la sección 7-1, donde se analiza el tema del espacio extracelular.



FIGURA 2-17. Protista flagelado aislado del intestino de una termita. Estos microorganismos poseen la celulasa requerida para digerir las partículas de madera ingeridas por el insecto. (Tomado de Eric Grave/Phototake.)

Lípidos

Los lípidos son un grupo de diversas moléculas biológicas no polares cuya única propiedad común es su capacidad para disolverse en solventes orgánicos, como cloroformo y benceno, y su incapacidad para disolverse en agua, propie-



FIGURA 2-18. La quitina es el componente primario del reluciente esqueleto externo de este saltamontes. (Según Robert y Linda Mitchell.)

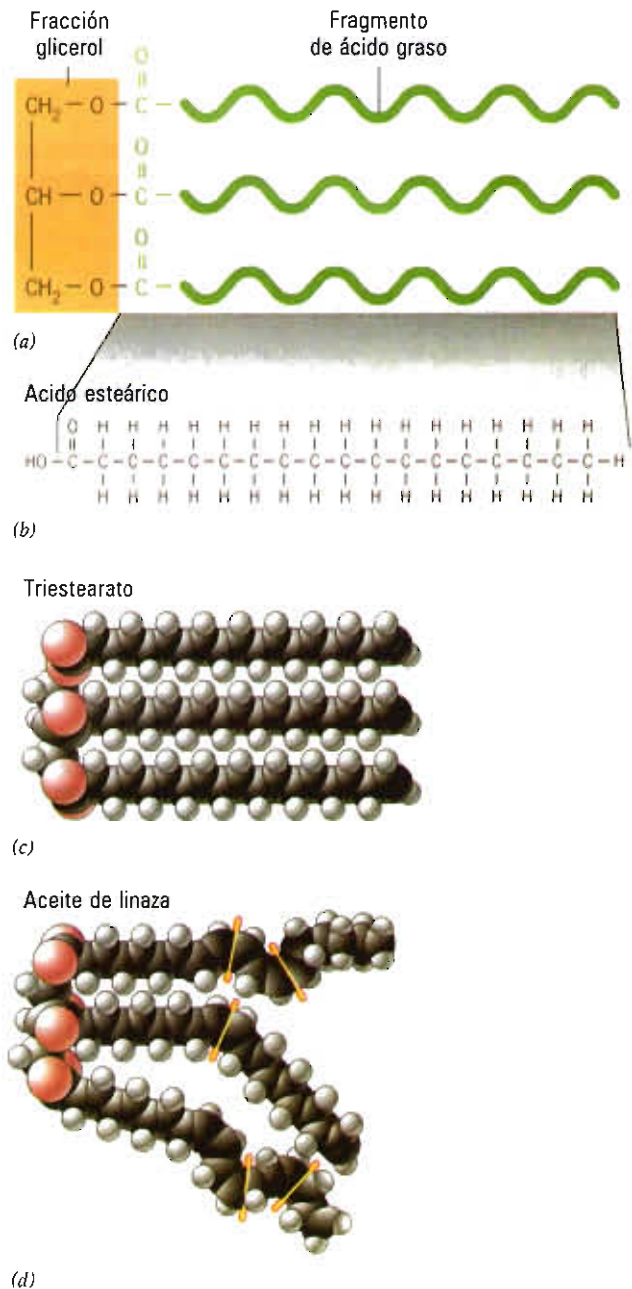


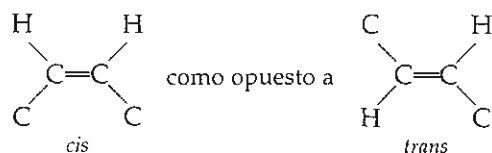
FIGURA 2-19. Grasas y ácidos grasos. *a)* Estructura básica de un triacilglicerol (también llamado triglicérido o grasa neutra). El radical glicerol indicado en color naranja está unido mediante tres enlaces éster al grupo carboxilo de tres ácidos grasos cuyos extremos se indican en verde. *b)* Acido esteárico, un ácido graso saturado de 18 carbonos común en grasas de animales. *c)* Modelo de espacios llenos del triestearato, un triacilglicerol que contiene tres cadenas idénticas de ácido esteárico. *d)* Modelo de espacio lleno del aceite de linaza, un triacilglicerol que contiene dos ácidos grasos insaturados diferentes derivados de las semillas del lino. Los sitios de insaturación, que producen enrollamientos en la molécula, se indica por barras de color amarillo-naranja.

dad que explica muchas de sus variadas funciones biológicas. Los lípidos importantes en la función celular incluyen grasas, esteroides y fosfolípidos. Aunque ninguna de estas moléculas lipídicas es lo bastante grande para llamarse macromolécula, con frecuencia se agregan (como en las gotas de grasa o en las membranas) para formar complejos suficientemente grandes que pueden verse con el microscopio de luz.

Grasas

Las **grasas** constan de una molécula de glicerol unida mediante un enlace éster a tres ácidos grasos; la molécula así formada se denomina **triacilglicerol** (fig. 2-19, a). Iniciaremos considerando la estructura de los ácidos grasos. Los **ácidos grasos** son hidrocarburos de cadena larga no ramificada con un solo grupo carboxilo en un extremo (fig. 2-19, b). Puesto que los dos extremos de la molécula de un ácido graso tienen estructura muy diferente, también tienen propiedades diferentes. La cadena del hidrocarburo es hidrofóbica, en tanto que el grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) que posee una carga negativa a pH fisiológico es hidrofílica. Las moléculas que tienen regiones hidrofóbicas e hidrofílicas se denominan **anfipáticas**; estas moléculas tienen propiedades biológicas importantes poco comunes. Las propiedades de los ácidos grasos se pueden apreciar considerando el empleo de un producto familiar, el jabón, que contiene ácidos grasos. Antiguamente, los jabones se elaboraban calentando grasa de animales en un álcali fuerte (NaOH o KOH) para romper los enlaces entre los ácidos grasos y el glicerol. En la actualidad, la mayor parte de los jabones se elaboran por síntesis. Los jabones deben su gran capacidad para disolver grasas al hecho de que el extremo hidrofóbico de cada ácido graso puede integrarse a la grasa, en tanto que el extremo hidrofílico puede interactuar con el agua que lo rodea. Como resultado, los materiales grasos se convierten en complejos (micelas) dispersables por el agua (fig. 2-20).

Los ácidos grasos difieren entre sí en la longitud de su cadena hidrocarbonada y la presencia o ausencia de dobles enlaces. En condiciones típicas, los ácidos grasos presentes en las células tienen una longitud que varía de 14 a 20 carbonos. Los ácidos grasos que carecen de dobles enlaces, como el ácido esteárico (fig. 2-19, b) se describe como **saturados**; los que poseen dobles enlaces son **no saturados**. Que las unidades para construir el ácido graso sean saturadas o no saturadas y el grado de insaturación (número de dobles enlaces) tienen consecuencias importantes. Los dobles enlaces (de configuración *cis*)



producen enrollamientos en una cadena de ácidos grasos. Por consiguiente, cuanto más dobles enlaces posea la cadena de ácidos grasos, más difícil será empacar estas largas cadenas. Esto disminuye la temperatura de fusión de un ácido graso que contiene lípidos. El triestearato, cuyos ácidos grasos carecen de dobles enlaces (fig. 2-19, c), es un

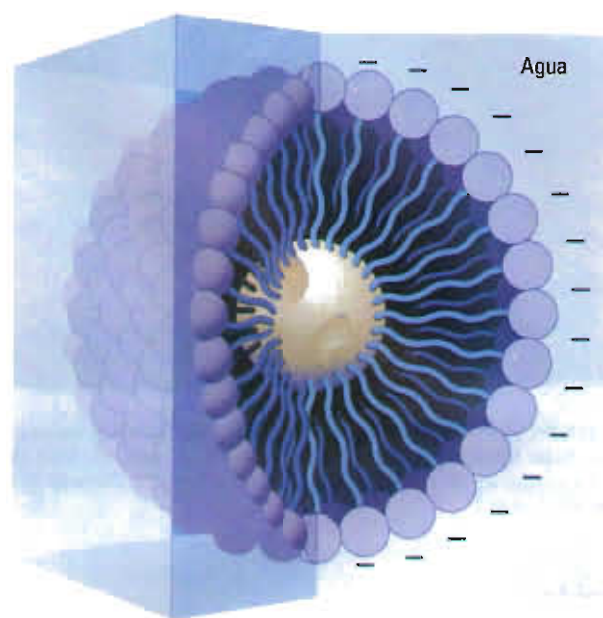


FIGURA 2-20. Los jabones constan de ácidos grasos. En este dibujo esquematizado de una micela de jabón, los extremos no polares de los ácidos grasos se dirigen hacia adentro, donde interactúan con la materia grasa que deben disolver. Las cabezas con carga negativa se localizan en la superficie de la micela donde interactúan con el agua que las rodea. Las membranas de proteínas, que también tienden a ser insolubles en agua, se pueden solubilizar en esta forma mediante la extracción de membranas con detergentes.

componente común de las grasas animales y se conserva en estado sólido a temperaturas muy por arriba de la ambiental. Por lo contrario, la abundancia de dobles enlaces en las grasas vegetales explica su estado líquido, tanto dentro de las células vegetales como en los armarios de las tiendas, así como el principio de la etiqueta de "poliinsaturadas". Las grasas líquidas a temperatura ambiente se denominan **aceites**. La figura 2-19, d, muestra la estructura del aceite de linaza, un lípido muy volátil extraído de las semillas de lino que se conserva en estado líquido a temperatura mucho más baja que el triestearato. Grasas sólidas, como la margarina, están formadas por aceites vegetales insaturados mediante la reducción química de los dobles enlaces por átomos de hidrógeno (proceso denominado **hidrogenación**). Una molécula de grasa puede contener tres ácidos grasos idénticos (como en la figura 2-19, c), o puede ser una **grasa mixta** que contiene más de una especie de ácido graso (como en la figura 2-19, d). La mayor parte de las grasas naturales, como el aceite de oliva o la mantequilla, son mezclas de moléculas que poseen diferentes especies de ácidos grasos.

Las grasas son muy ricas en energía química; un gramo de grasa contiene el doble de la energía de un gramo de carbohidrato (por razones que se analizan en la sección 3-1). Los carbohidratos funcionan principalmente como fuente de energía rápidamente disponible a corto plazo, en tanto que las reservas de grasa almacenan energía a largo plazo. Se estima que una persona de estatura promedio contiene cerca de 0.5 de kilogramo (kg) de carbohidratos, principal-

mente en forma de glucógeno. Esta cantidad de carbohidratos suministra unas 2 000 kcal de energía total. En el curso de un día de ejercicio extenuante una persona puede agotar casi toda la reserva de carbohidratos de su cuerpo. Por lo contrario, la persona promedio contiene cerca de 16 kg de grasa (equivalente a 144 000 kcal de energía), y como todos sabemos, puede tomar mucho tiempo agotar nuestra reserva de este material.

Puesto que las grasas carecen de grupos polares, son sumamente insolubles en agua y se almacenan en las células en forma de gotas de lípidos secos. Como las gotas de lípidos no contienen agua como los gránulos de glucosa, representan un almacén de combustible muy concentrado. En muchos animales, las grasas se almacenan en células especiales (*adipocitos*) cuyo citoplasma se llena con una sola gota de grasa. Los adipocitos muestran una notable capacidad para cambiar de volumen y adaptarse a cantidades variables de grasa.

Esteroides

Los esteroides se construyen alrededor de un esqueleto característico de cuatro anillos de hidrocarburo. Unos de los esteroides más importantes es el colesterol, componente de las membranas celulares de animales y precursor para las síntesis de numerosas hormonas esteroides, como testosterona, progesterona y estrógenos (fig. 2-21). El colesterol está ausente principalmente en células vegetales, y por esta razón los aceites vegetales se consideran "libres de colesterol", pero las membranas celulares de las plantas a veces

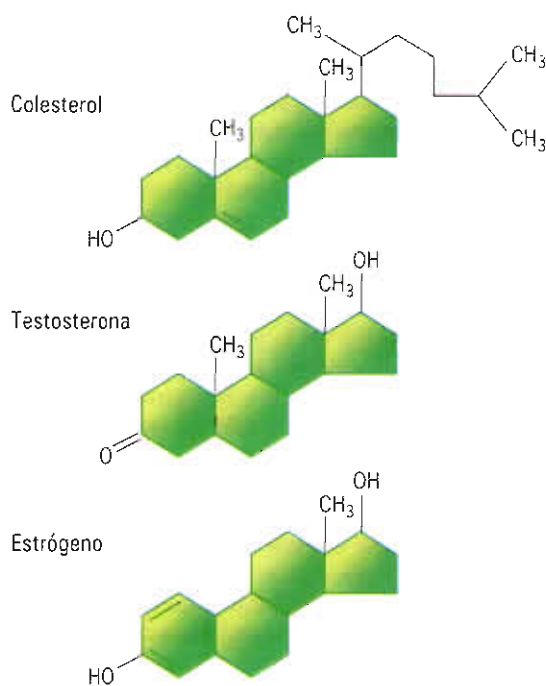


FIGURA 2-21. Estructura de los esteroides. Todos los esteroides comparten el mismo esqueleto básico de cuatro anillos. Diferencias aparentemente mínimas de estructura química entre colesterol, testosterona y estrógenos generan profundas diferencias biológicas.

contienen grandes cantidades de compuestos relacionados con colesterol.

Fosfolípidos

En la figura 2-22 se muestra la estructura de un fosfolípido común. La molécula recuerda una grasa (triacilglicerol) pero sólo tiene dos cadenas de ácidos grasos en vez de tres; es un *diacilglicerol*. El tercer grupo hidroxilo del esqueleto del glicerol está unido mediante un enlace covalente a un grupo fosfato (en vez de un tercer ácido graso), que a su vez mantiene un enlace covalente con un pequeño grupo polar como la colina, según se muestra en la figura 2-22. Así, las moléculas de grasa, a diferencia de los fosfolípidos, contienen dos extremos con propiedades muy diferentes: un extremo que contiene el grupo fosfato y tiene carácter claramente hidrofílico, en tanto que el otro extremo compuesto de dos colas de ácido graso tiene carácter distintivamente hidrofóbico. Puesto que la única y principal función celular de los fosfolípidos se deriva de su presencia en la membrana celular, y dado que las propiedades de las membranas celulares dependen de sus elementos fosfolípidos, estudiaremos la estructura de otros fosfolípidos y sus funciones en relación con las membranas celulares en la sección 4-2.

Proteínas

Las proteínas son las macromoléculas que ejecutan prácticamente todas las actividades de la célula; son las moléculas encargadas de que las cosas ocurran. Se estima que una célula típica de un mamífero puede tener hasta 10 000 proteínas diferentes en diversas disposiciones y funciones. Como enzimas, las proteínas aceleran grandemente la velocidad de las reacciones metabólicas; como fibras estructurales, las proteínas suministran apoyo mecánico dentro de las células y en su perímetro exterior (fig. 2-23, a); como hormonas, factores de crecimiento y activadores de gen, las proteínas

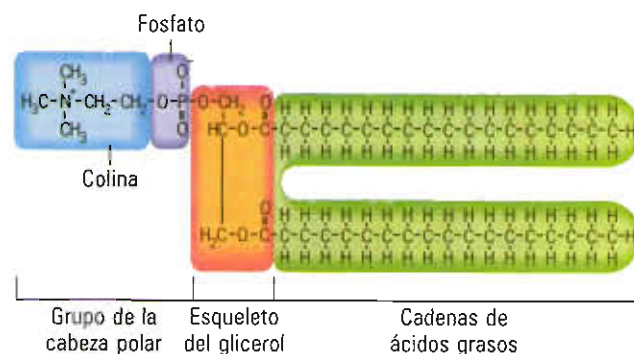
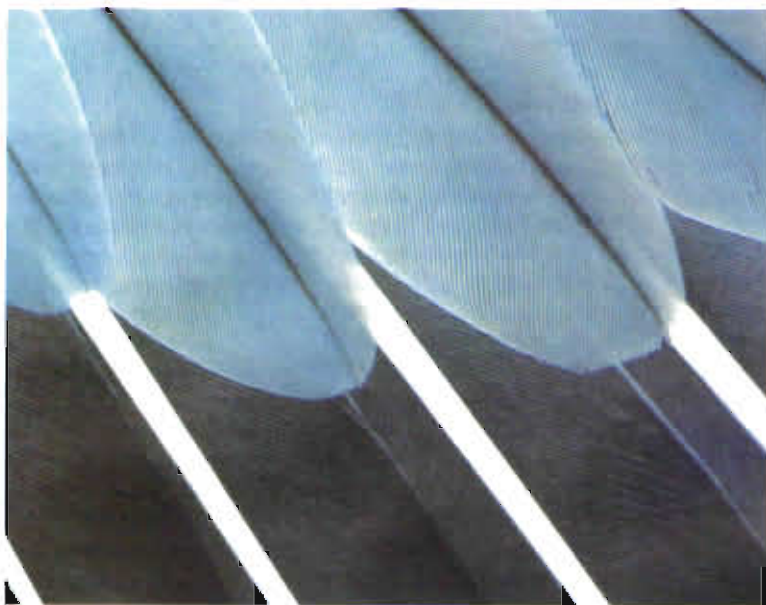


FIGURA 2-22. Fosfatidilcolina, un fosfolípido común. La molécula consta de un esqueleto de glicerol cuyos grupos hidroxilo se enlazan en forma covalente a dos ácidos grasos y un grupo fosfato. El grupo fosfato posee carga negativa y también se enlaza a un grupo colina pequeño con carga positiva. El extremo de la molécula que contiene la fosforilcolina es muy hidrosoluble, en tanto que el extremo opuesto, que consta de un ácido graso, es insoluble en agua. La estructura y función de la fosfatidilcolina y de otros fosfolípidos se analiza en detalle en la sección 4-2.



(a)



(b)

FIGURA 2-23. Dos ejemplos de los miles de estructuras biológicas compuestas de manera predominante por proteínas. Estas incluyen: a) plumas, empleadas para aislamiento térmico, para volar y para reconocer el sexo de la aves, y b) el cristalino del ojo, como el de esta araña, que le sirve para enfocar los rayos de luz. (a: Tomado de Frans Lanting/Allstock, Inc./Tony Stone Images, New York; b: Mantis Wildlife Films/Oxford Scientific Films/Animals Animals)

ejecutan una gran variedad de funciones reguladoras; como receptores y transportadores en la membrana, las proteínas determinan cuáles células reaccionan y qué tipos de sustancias penetran o salen de la célula; como elementos contráctiles, las proteínas constituyen el mecanismo biológico del movimiento. Entre sus muchas y diversas funciones, las proteínas actúan como anticuerpos, sirven como toxinas, forman coágulos sanguíneos, absorben o refractan la luz (fig. 2-23, b) y transportan sustancias de una parte del cuerpo a otra.

¿Cómo puede un tipo de molécula tener tan variadas funciones? La explicación reside en las formas prácticamente ilimitadas que pueden adoptar las proteínas *como grupo*. En otras palabras, las proteínas son capaces de una variedad tan amplia de actividades debido a la gran diversidad de estructuras que pueden formar. Sin embargo, dentro de este grupo cada proteína tiene una estructura única altamente ordenada que le permite efectuar una función particular. Lo más importante es que las proteínas tienen formas que les permiten interactuar *de manera selectiva* con otras moléculas. En otras palabras, las proteínas muestran un alto grado de **especificidad**, propiedad que les ayuda a mantener el orden y la complejidad característicos de la vida.

Unidades estructurales de las proteínas

Las proteínas son polímeros formados por monómeros aminoácidos. Cada proteína tiene una secuencia única de aminoácidos que confiere a la molécula sus propiedades únicas. Gran parte de las propiedades de una proteína se pueden entender examinando las propiedades químicas de

los aminoácidos que las constituyen. En las proteínas se encuentran comúnmente 20 aminoácidos diferentes, sean proteínas de un virus o de un ser humano. Hay dos aspectos de la estructura de los aminoácidos que deben considerarse: las que son comunes a todos ellos y las que son únicas para cada uno. Empezaremos con las propiedades compartidas.

Estructura de los aminoácidos. Todos los aminoácidos poseen un grupo amino y un grupo carboxilo separados entre sí por un solo átomo de carbono, el carbono α (fig. 2-24, a, b). En la página 43 vimos que el átomo de carbono de las moléculas de azúcar se enlaza a cuatro grupos diferentes en dos configuraciones (estereoisómeros) que no pueden superponerse entre sí. Lo mismo es cierto para los aminoácidos. Con excepción de la glicina, el carbono α de los aminoácidos se enlaza a cuatro grupos diferentes, de modo que cada aminoácido existe en una forma D y una L (fig. 2-25). Los aminoácidos aislados de las proteínas, cualquiera que sea su origen, son aminoácidos L. ¿Por qué no se encuentran aminoácidos D de las proteínas? Esta es una pregunta interesante y debatida desde hace mucho tiempo.

Durante el proceso de síntesis de proteínas, cada aminoácido se une a otros dos aminoácidos formando un polímero largo, continuo, no ramificado, denominado **cadena de polipéptidos**. Los aminoácidos que componen una cadena de polipéptidos se juntan por **enlaces peptídicos** como resultado de la unión del grupo carboxilo de un aminoácido con el grupo amino de su vecino, eliminando una molécula de agua (fig. 2-24, c). Una cadena de polipéptidos compuesta de una cadena de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos tiene el siguiente esqueleto:

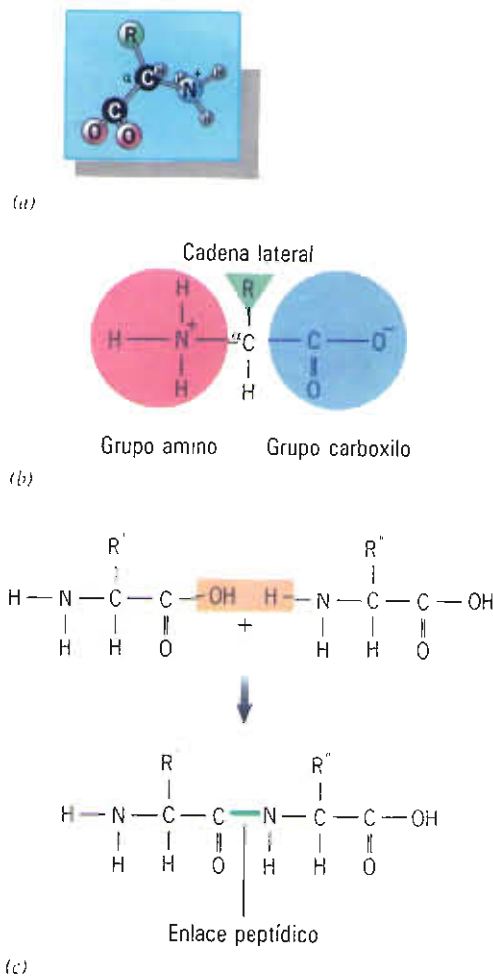
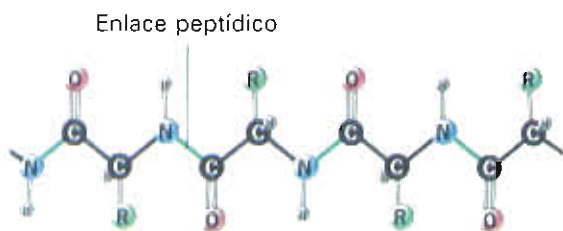


FIGURA 2-24. Estructura de los aminoácidos. Modelo de esferas y palitos (a) y fórmula química (b) de un aminoácido generalizado en el cual R puede ser cualquiera de un gran número de grupos químicos (véase figura 2-26). En solución neutra, el grupo α carboxilo pierde su protón y existe cargado negativamente ($-\text{COO}^-$), y el grupo α amino acepta un protón y existe cargado positivamente ($-\text{NH}_3^+$). c) La condensación de dos aminoácidos produce un enlace peptídico dibujado aquí en su estado sin carga. En la célula, esta reacción ocurre sobre un ribosoma conforme se transfiere un aminoácido del transportador (una molécula RNA t) sobre el extremo de una cadena de polipéptidos en crecimiento.



Una vez incorporados a una cadena de polipéptidos los aminoácidos se llaman *residuos*. El residuo del extremo de la cadena, el *N-terminal*, contiene un aminoácido con un grupo α -amino libre (no enlazado), en tanto que el residuo

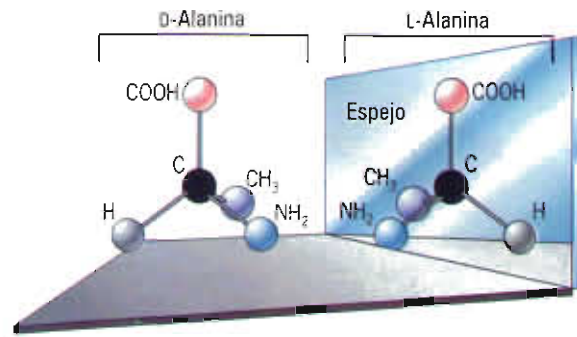


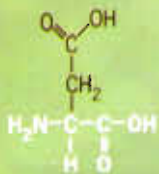
FIGURA 2-25. Estereoisomerismo de aminoácidos. Puesto que el carbono α de todos los aminoácidos, excepto la glicina, se encuentra unido a cuatro grupos diferentes, puede haber dos estereoisómeros. Se muestran las formas D y L de la alanina.

del extremo opuesto, el *C-terminal*, tiene un grupo α -carboxilo libre.

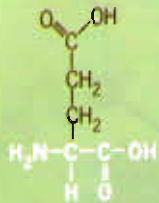
Propiedades de los grupos R. El esqueleto de una cadena de polipéptidos está compuesto por la parte común de cada aminoácido entre ellos. El resto de cada aminoácido, el **grupo R** o **cadena lateral** (véase fig. 2-26), es muy variable entre los 20 bloques de construcción y esta variabilidad confiere a las proteínas su versatilidad. Si se consideran todos los aminoácidos en conjunto, hay una gran variedad de reacciones orgánicas en las cuales pueden participar y formar una variedad mucho mayor de tipos de enlace. Las variadas características de los grupos R de los aminoácidos son importantes en las interacciones *intramoleculares* que determinan la estructura de la molécula y en las interacciones *intermoleculares* que determinan las actividades que puede efectuar la proteína.

Los aminoácidos se clasifican convenientemente según las características polar y no polar de sus grupos R. Por lo regular pertenecen a cuatro categorías: polar con carga, polar sin carga, no polar y aquellos con propiedades únicas (fig. 2-26).

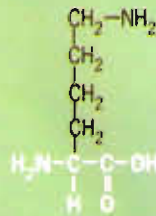
1. Polar con carga. Los aminoácidos de este grupo incluyen ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y arginina. Estos cuatro aminoácidos contienen grupos R capaces de contener carga neta; o sea, los grupos R contienen ácidos y bases orgánicos relativamente fuertes. Las reacciones de ionización del ácido glutámico y de la lisina se muestran en la figura 2-27. A pH fisiológico, los grupos R de estos aminoácidos casi siempre presentan carga neta. Por consiguiente, son capaces de formar enlaces iónicos con otras especies cargadas dentro de las células. Por ejemplo, los residuos de arginina con carga positiva de las proteínas histona se unen mediante enlaces iónicos con los grupos fosfato cargados negativamente de DNA (véase fig. 2-3). La histidina también se considera un aminoácido polar cargado, aunque en la mayor parte de los casos sólo presenta carga parcial a pH fisiológico. En realidad, debido a su capacidad para ganar o perder un protón en el intervalo de pH fisiológico, la histidina es un residuo particularmente importante en la región activa de muchas proteínas.

Polar con carga neta

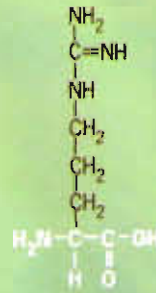
Ácido aspártico
(Asp o D)



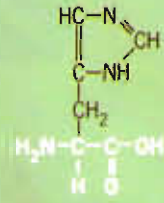
Ácido glutámico
(Glu o E)



Lisina
(Lis o K)



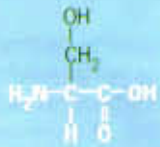
Arginina
(Arg o R)



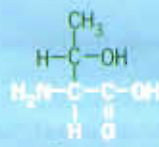
Histidina
(His o H)

Propiedades del grupo R:

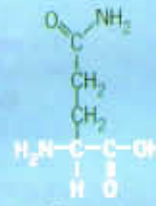
Los grupos hidrofílicos R actúan como ácidos o bases con tendencia a mostrar carga completa (+ o -) en condiciones fisiológicas. Los grupos R forman enlaces iónicos y con frecuencia participan en reacciones químicas.

Polar sin carga neta

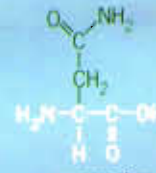
Serina
(Ser o S)



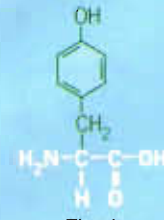
Treonina
(Tr o T)



Glutamina
(Gln o Q)



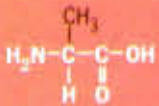
Asparagina
(Asn o N)



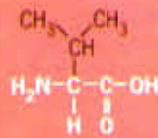
Tirosina
(Tir o Y)

Propiedades del grupo R:

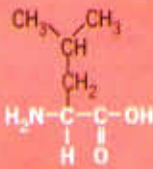
Los grupos hidrofílicos R tienden a mostrar carga parcial + o - que les permite participar en reacciones químicas, forman enlaces H y se asocian al agua.

No polar

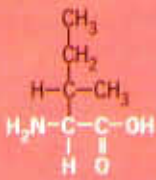
Alanina
(Ala o A)



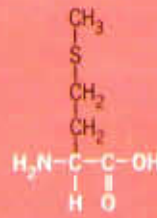
Valina
(Val o V)



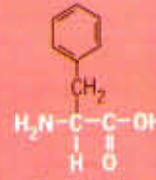
Leucina
(Leu o L)



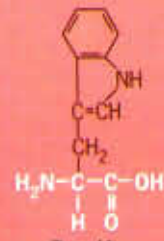
Isoleucina
(Ile o I)



Metionina
(Met o M)



Fenilalanina
(Fen o F)



Triptófano
(Trp o W)

Propiedades del grupo R:

Los grupos hidrofóbicos R constan casi por completo de átomos de C y H. Estos aminoácidos tienden a formar el núcleo más interno de las proteínas solubles, ocultos del medio acuoso. Desempeñan un papel importante en las membranas porque se asocian a la bicapa de lípidos.

Grupos R con propiedades únicas

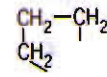
Glicina
(Gli o G)

El grupo R sólo contiene un átomo de hidrógeno y puede adaptarse a un ambiente hidrofílico o hidrofóbico. La glicina a menudo reside en sitios donde dos polipéptidos entran en contacto íntimo.



Cisteína
(Cis o C)

Aunque el grupo R es polar, presenta características de grupo no cargado, tiene la propiedad especial de formar un enlace covalente con otra cisteína para formar una unión disulfuro.



Prolina
(Pro o P)

Aunque el grupo R es de carácter hidrofóbico tiene la propiedad especial de crear enrollamientos en las cadenas de polipéptidos y romper estructuras secundarias ordenadas.

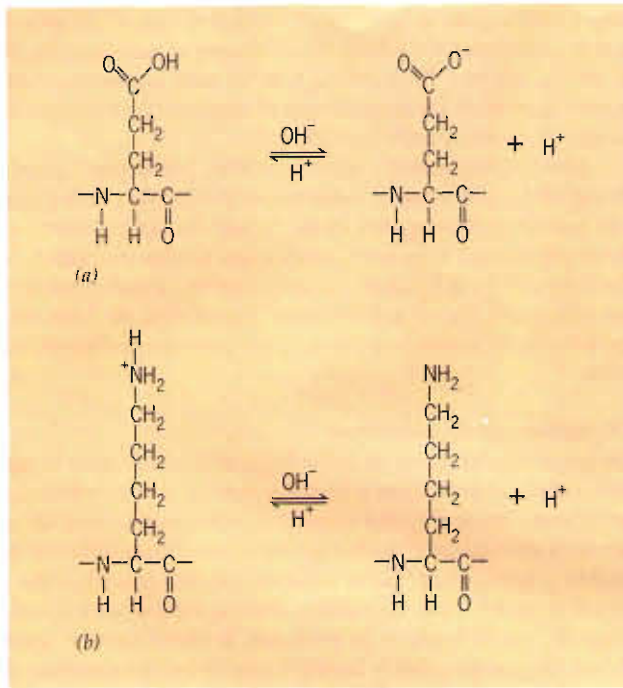


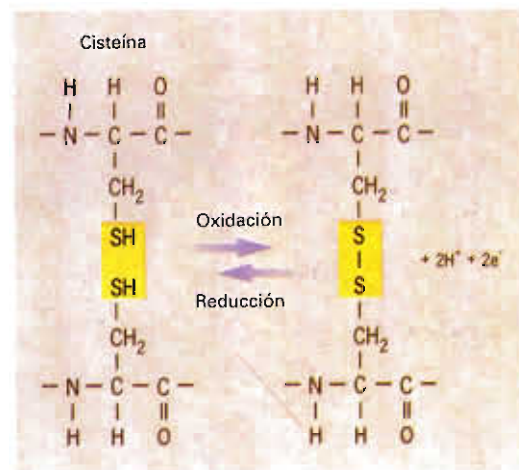
FIGURA 2-27. Ionización de aminoácidos polares cargados. a) El grupo R del ácido glutámico pierde un protón cuando su grupo ácido carboxílico se ioniza. El grado de ionización del grupo carboxilo depende del pH del medio: cuanto mayor sea la concentración de hidrógenos (pH más bajo), menor es el porcentaje de grupos carboxilo presentes en estado ionizado. Inversamente, una elevación del pH incrementa la ionización del protón del grupo carboxilo, aumentando el porcentaje de grupos R con carga negativa del ácido glutámico. El pH al cual 50% de los grupos R se ionizan y 50% no lo están se denomina pK, que para el grupo R del ácido glutámico libre es de 4.4. A pH fisiológico prácticamente todos los residuos de ácido glutámico poseen carga negativa. b) El grupo R de la lisina se ioniza cuando su grupo amino gana un protón. Cuanto mayor sea la concentración de ion hidroxilo (pH más alto) menor el porcentaje de grupos amino con carga positiva. El pH al cual 50% de los grupos R de lisina están cargados y 50% no lo están es 10.0, el pK para el grupo R de lisina libre. A pH fisiológico, prácticamente todos los residuos de lisina poseen carga positiva.

2. Polar sin carga. Los grupos R de estos aminoácidos sólo son débilmente ácidos o básicos. Aunque estos grupos no tienen carga completa a pH fisiológico, contienen átomos con carga parcial negativa o positiva y por lo tanto pueden formar enlaces de hidrógeno con otras moléculas, incluyendo el agua. Estos aminoácidos casi siempre son muy reactivos. En esta categoría se incluyen asparagina y glutamina (amidas del ácido aspártico y del ácido glutámico), treonina, serina y tirosina.

FIGURA 2-26. Estructura química de los aminoácidos. Estos 20 aminoácidos representan a los que se encuentran con mayor frecuencia en las proteínas y, más específicamente, a los codificados por DNA. Puede haber otros aminoácidos como consecuencia de la modificación de alguno de los aquí mostrados. Los aminoácidos se disponen en cuatro grupos, como se describe en el texto, y se muestran en su estado no ionizado.

3. No polar. En el otro extremo, aparte de los incluidos en la primera categoría se encuentran los aminoácidos cuyas cadenas laterales son hidrofóbicas y no tienen capacidad para formar enlaces electrostáticos o interactuar con el agua. Los aminoácidos de esta categoría son alanina, valina, leucina, isoleucina, triptófano, fenilalanina y metionina. Las cadenas laterales de los aminoácidos no polares por lo general carecen de oxígeno y nitrógeno. Varían sobre todo en forma y tamaño, esto permite a algunos de ellos introducirse apretadamente en un espacio particular dentro del núcleo de una proteína, reuniéndose entre sí como consecuencia de las fuerzas de van der Waals y de interacciones hidrofóbicas.

4. Los otros tres aminoácidos, glicina, prolina y cisteína, tienen propiedades únicas que los distinguen de los demás. El grupo R de la glicina consta de un solo átomo de hidrógeno y sólo por esta razón la glicina es un aminoácido muy importante. Debido a la falta de una cadena lateral, los residuos de glicina permiten que los esqueletos de dos polipéptidos (o de dos segmentos del mismo polipéptido) se aproximen entre sí muy estrechamente. Además, la glicina es más flexible que otros aminoácidos y es útil en las porciones del esqueleto que necesitan moverse o formar articulaciones. La prolina es única porque tiene sus grupos α -amino como parte de un anillo (convirtiéndola en un iminoácido). La prolina es un aminoácido hidrofóbico que no adopta con facilidad una estructura secundaria ordenada (que analizaremos posteriormente). La cisteína contiene un grupo sulfhidrilo (-SH) reactivo que con frecuencia aparece unido a otro residuo de cisteína mediante un enlace covalente, como un **punto de disulfuro** (-SS-).



Los puentes de disulfuro casi siempre se forman entre dos cisteínas distantes entre sí en el esqueleto del polipéptido o incluso en dos polipéptidos separados. Estos puentes disulfuro ayudan a estabilizar las intrincadas formas de proteínas, particularmente las que se presentan fuera de las células donde están sujetas a tensión física adicional.

No todos los aminoácidos descritos antes se encuentran en todas las proteínas, ni todos los aminoácidos presentes están distribuidos de manera equivalente. También hay algunos otros aminoácidos en las proteínas, pero son resultado de la alteración de uno de los 20 aminoácidos básicos *después* de incorporarse a la cadena del polipéptido.

El carácter iónico, polar o no polar, de la cadena lateral de los aminoácidos es muy importante en la estructura y función de la proteína. Las proteínas más solubles (es decir, que no forman parte de la membrana) están construidas de modo que los residuos polares se sitúen en la superficie de la molécula donde puedan unirse con las moléculas de agua circunvecinas y contribuir a la solubilidad de la proteína en solución acuosa (fig. 2-28, *a*). Por lo contrario, los residuos no polares se encuentran empacados en el núcleo central de la molécula, lejos del medio acuoso (fig. 2-28, *b*). En muchas enzimas, grupos polares reactivos se proyectan en el interior no polar y confieren a la proteína su actividad catalítica. Por ejemplo, un medio no polar incrementa mucho las interacciones iónicas entre grupos cargados que en un ambiente acuoso se reducirían por competencia con el agua. Algunas reacciones que proceden a una velocidad imperceptible en el agua ocurren en milésimas de segundo dentro de una proteína.

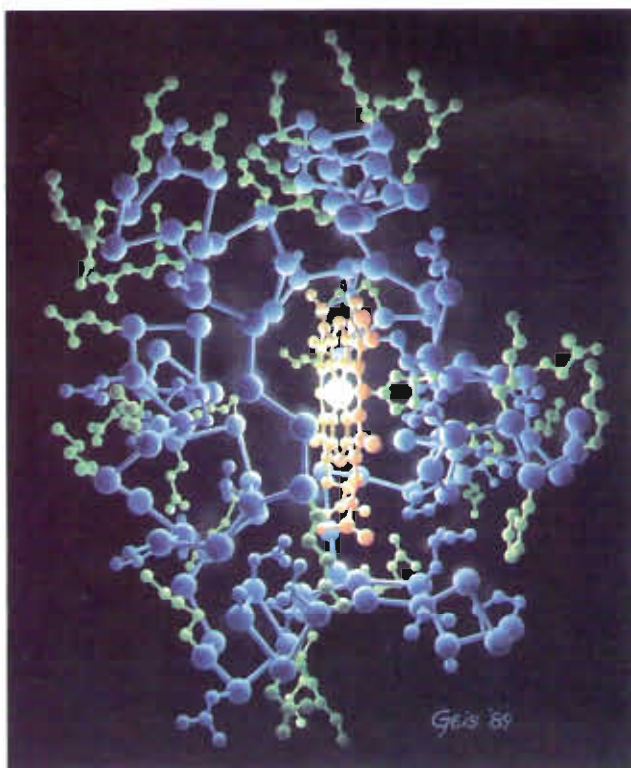
Cuando se consideren las proteínas de la membrana en el capítulo 4 será más evidente la importancia de la localiza-

ción de los residuos hidrofóbico e hidrofílico. El arreglo de hidrofóbico adentro e hidrofílico afuera es una adaptación al medio acuoso. Si se altera mucho este ambiente, como ocurre dentro de las membranas biológicas, la organización de las proteínas puede invertirse.

Muchas proteínas contienen otras sustancias además de aminoácidos; éstas se denominan **proteínas conjugadas**. Las proteínas conjugadas incluyen las unidas mediante enlaces covalentes o no covalentes a los ácidos nucleicos, las *nucleoproteínas*; a lípidos, las *lipoproteínas*; a carbohidratos, las *glucoproteínas*; o a diferentes materiales de bajo peso molecular, incluyendo metales y grupos que contienen metales.

Estructura de las proteínas

En ninguna otra parte de la biología se ilustra mejor la relación íntima entre forma y función que en las proteínas. Las proteínas son moléculas enormes, complejas, pero su estructura en cualquier ambiente dado es completamente definible y predecible. Cada aminoácido de una proteína se localiza en un sitio específico dentro de estas moléculas gigantes confiriendo a la proteína la estructura y reactividad necesarias para la función que debe desempeñar. La estructura de la proteína se puede describir a diferentes niveles de organización, cada uno remarcando un aspecto diferente y a su vez cada uno dependiente de diferentes



(a)



(b)

FIGURA 2-28. Disposición de los aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos en la proteína soluble citocromo c. *a*) Las cadenas laterales hidrofílicas, mostradas en color verde, se localizan principalmente en la superficie de la proteína donde entran en contacto con el medio acuoso que las rodea. *b*) Los residuos hidrofóbicos, mostrados en rojo, se localizan sobre todo en el centro de la proteína, en especial en la vecindad del grupo hem central. (Copyright Irving Geis.)

tipos de interacciones. De ordinario se describen cuatro niveles: *primario*, *secundario*, *terciario* y *cuaternario*. El primero, la estructura primaria, se refiere a la secuencia de aminoácidos de una proteína, en tanto que los otros tres niveles se relacionan con la organización de la molécula en el espacio.

Estructura primaria. La estructura primaria de un polipéptido es la secuencia lineal de aminoácidos específicos que constituyen la cadena. Con 20 diferentes bloques de construcción, el número de polipéptidos variados que puede formarse es 20^n , donde n es el número de aminoácidos en la cadena. Puesto que la mayor parte de los polipéptidos contienen más de 100 aminoácidos (y algunos miles), la variedad de posibles secuencias es prácticamente ilimitada. La información del orden preciso de los aminoácidos en cada proteína que un organismo puede producir se incluye en la herencia genética de dicho organismo.

Como veremos después, la secuencia de aminoácidos suministra la mayor parte, si es que no toda, la información requerida para determinar la configuración tridimensional de la molécula y por lo tanto su función. Por consiguiente, la secuencia de aminoácidos es de la mayor importancia y los cambios que se originan en dicha secuencia como resultado de mutaciones genéticas del DNA no se pueden tolerar fácilmente. El primer ejemplo y mejor estudiado de esta relación es el cambio en la secuencia de aminoácidos de la hemoglobina que da como resultado la enfermedad *anemia drepanocítica*. Esta anemia grave, hereditaria, es resultado de un solo cambio en la secuencia de aminoácidos dentro de la molécula (fig. 2-29, *a, b*); en el sitio donde normalmente se encuentra un ácido glutámico hay una valina. Esto corresponde a la sustitución de un aminoácido polar con carga por uno no polar (véase fig. 2-26). Todos los problemas relacionados con la forma del eritrocito (fig. 2-29, *c*) y la disminución de la capacidad para transportar oxígeno en las personas con anemia drepanocítica son consecuencia

de este único cambio. En muchos otros casos los cambios de los aminoácidos tienen poco efecto, según puede observarse por las diferencias en la secuencia de aminoácidos de una misma proteína entre organismos relacionados. El grado de tolerancia de los cambios en la secuencia primaria dependen de la magnitud de la alteración en la forma de la proteína o de los residuos funcionales críticos.

La secuencia de aminoácidos de una proteína fue determinada por primera vez a principios de los años 1950 por Frederick Sanger y sus colaboradores, en la Universidad de Cambridge, empleando una hormona, la proteína insulina. Para trabajar se eligió la insulina de ternera debido a su disponibilidad y a su pequeño tamaño: dos cadenas de polipéptidos de 21 y 30 aminoácidos cada una. La *secuenciación* de la insulina fue una verdadera proeza en el reciente campo de la biología molecular. Reveló que las proteínas, las moléculas más complejas de la célula, tenían una subestructura específica definible que no era regular ni repetitiva, como la de los polisacáridos. En la actualidad se ha logrado la secuenciación de varios miles de proteínas, lo que ha suministrado información valiosa acerca de sus estructuras, mecanismos de acción y evolución.

Estructura secundaria. Toda la materia existe en el espacio y por lo tanto tiene una estructura tridimensional. Las proteínas se forman mediante uniones entre un gran número de átomos; por consiguiente, su forma es compleja. El término **conformación** se refiere al arreglo tridimensional de los átomos de la molécula, o sea, su organización espacial. La estructura secundaria describe la conformación de partes de la cadena de polipéptidos. Los primeros estudios acerca de la estructura secundaria de las proteínas fueron efectuados por Linus Pauling y Robert Corey del Cali-

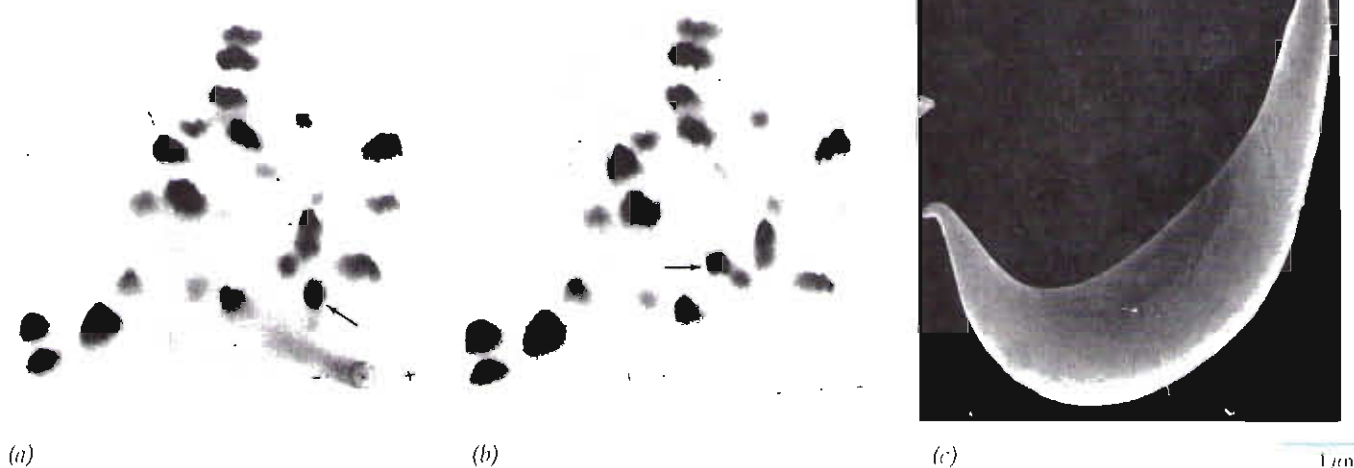


FIGURA 2-29. Bases moleculares de la anemia drepanocítica. *a, b*) Cromatografías que muestran la separación de péptidos obtenidos mediante tratamiento de la hemoglobina normal (*a*) o de la hemoglobina de un drepanocito (*b*) con la enzima proteolítica tripsina. Las dos cromatografías son idénticas, con excepción de un péptido (marcado) que contiene un solo aminoácido diferente. *c*) Micrografía de exploración electrónica de eritrocitos de una persona con anemia drepanocítica. Compárese con la micrografía de un eritrocito de sangre normal de la figura 4-31, *a*. Debido a su forma anormal, estos drepanocitos de la sangre pueden taponar vasos de pequeño calibre, causar dolor y provocar crisis que ponen en peligro la vida. (*a, b*: según Corrado Baglioni, *Biochim. Biophys. Acta* 48:2394, 1961; *c*: cortesía de J.T. Thornwaite, B.F. Cameron y R.C. Leif.)

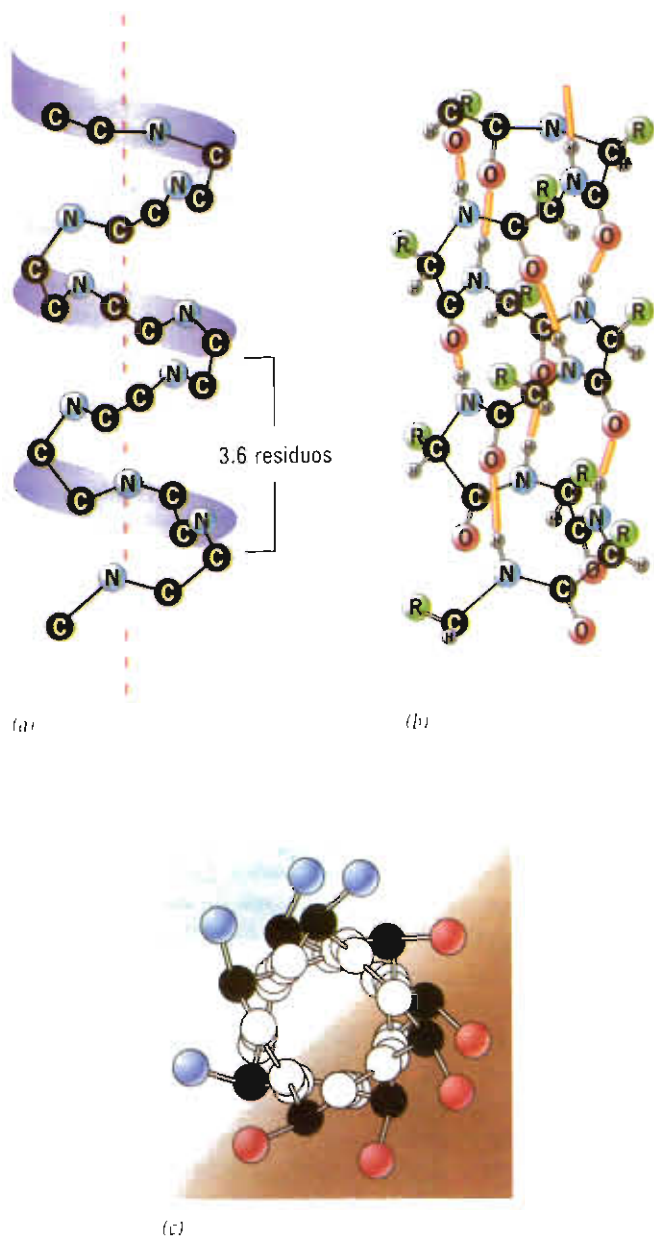


FIGURA 2-30. La hélice alfa. *a)* Trayecto helicoidal alrededor de un eje central que adopta el esqueleto de un polipéptido en una región de la hélice alfa. Cada vuelta completa (360°) de la hélice corresponde a 3.6 residuos de aminoácidos. *b)* Disposición de los átomos del esqueleto de una hélice alfa y el enlace de hidrógeno que se forma entre aminoácidos. Debido a la rotación helicoidal, los enlaces peptídicos de cada cuarto aminoácido se ponen en estrecha vecindad. El acercamiento del grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) de un enlace péptido al grupo imina ($\text{H}-\text{N}$) de otro enlace péptido da como resultado la formación

de un enlace de hidrógeno entre ellos. Los enlaces de hidrógeno (barras de color naranja) son prácticamente paralelos al eje del cilindro y por lo tanto sostienen las vueltas de la cadena. *c)* Vista desde abajo del centro de una hélice α con las cadenas laterales proyectándose hacia afuera del esqueleto del polipéptido. La cara de la hélice proyectada hacia el medio externo acuoso consta de residuos de aminoácidos polares, en tanto que la cara expuesta al ambiente interior de la proteína consta de residuos hidrofóbicos. Una hélice con este tipo de estructura se denomina anfipática.

de un enlace de hidrógeno entre ellos. Los enlaces de hidrógeno (barras de color naranja) son prácticamente paralelos al eje del cilindro y por lo tanto sostienen las vueltas de la cadena. *c)* Vista desde abajo del centro de una hélice α con las cadenas laterales proyectándose hacia afuera del esqueleto del polipéptido. La cara de la hélice proyectada hacia el medio externo acuoso consta de residuos de aminoácidos polares, en tanto que la cara expuesta al ambiente interior de la proteína consta de residuos hidrofóbicos. Una hélice con este tipo de estructura se denomina anfipática.

fornia Institute of Technology. Estudiando la estructura de péptidos simples que consisten en unos pocos aminoácidos unidos, Pauling y Corey concluyeron que las cadenas de polipéptidos existen en conformaciones preferidas que suministran el número máximo posible de enlaces de hidrógeno entre aminoácidos vecinos. Se propusieron dos conformaciones.

En una conformación el esqueleto del polipéptido adopta la forma de una espiral cilíndrica denominada **hélice alfa** (α) (fig. 2-30, *a*). El esqueleto corresponde al interior de la hélice y las cadenas laterales se proyectan hacia afuera. La estructura helicoidal se estabiliza mediante un gran número de enlaces de hidrógeno entre los átomos de un péptido enlazado y los situados justo arriba y debajo a lo largo de la espiral (fig. 2-30, *b*). Los patrones de difracción de rayos X de proteínas verdaderas, determinados durante el decenio de 1950, revelaron la existencia de hélices α , primero en la proteína queratina del cabello y después en varias proteínas que se enlazan a oxígeno, como la mioglobina y la hemoglobina (véase fig. 2-35). Las superficies opuestas de una hélice α pueden tener propiedades contrastantes. En las hidrosolubles, la superficie externa de una hélice alfa con frecuencia contiene residuos polares en contacto con el solvente, en tanto que la superficie enfrentada al interior contiene grupos R no polares (fig. 2-30, *c*). Esta disposición de residuos polares y no polares con frecuencia se invierte en las hélices alfa de proteínas de la membrana que atraviesan la bicapa lipídica hidrofóbica (véase fig. 4-16).

Una hélice α se encuentra enrollada y fija mediante enlaces no covalentes débiles, y por lo tanto puede extenderse cuando es sometida a fuerzas de estiramiento. Esto se puede ilustrar con la lana, cuyas fibras de proteína consisten principalmente en hélices alfa. Cuando las fibras de lana se estiran, se rompen los enlaces de hidrógeno y las fibras se alargan. Cuando se libera la tensión, los enlaces vuelven a formarse y la fibra se acorta a su longitud original. El cabello humano es menos extensible que la lana, debido a que los polipéptidos también están estabilizados por puentes disulfuro covalentes.

La otra conformación propuesta por Pauling y Corey fue la **lámina plegada beta** (β), que consiste en varios polipéptidos paralelos entre sí. A diferencia de la forma cilíndrica helicoidal de la hélice α , el esqueleto de cada polipéptido (o **fibra β**) en una lámina β asume una conformación con pliegues o dobleces (fig. 2-31, *a*). Igual que la hélice alfa, la lámina β también se caracteriza por un gran número de enlaces de hidrógeno, pero estas uniones no covalentes son perpendiculares al eje largo de la cadena de polipéptidos y se proyecta transversalmente desde un lado de la cadena hacia el otro (fig. 2-31, *b*). Como la hélice alfa, la lámina β también se encuentra en muchas proteínas diferentes. Así, la cadena de aminoácidos casi está completamente extendida y por lo tanto la lámina β resiste las fuerzas de tensión (ténsiles). La seda es una proteína que consiste sobre todo en láminas β ; las fibras de seda deben su resistencia a esta característica arquitectónica.

Las porciones de una cadena de polipéptidos no organizada en hélices α o láminas β pueden consistir en bisagras, vueltas, asas o extensiones digitiformes. Con frecuencia estas son las partes más sensibles de una cadena de

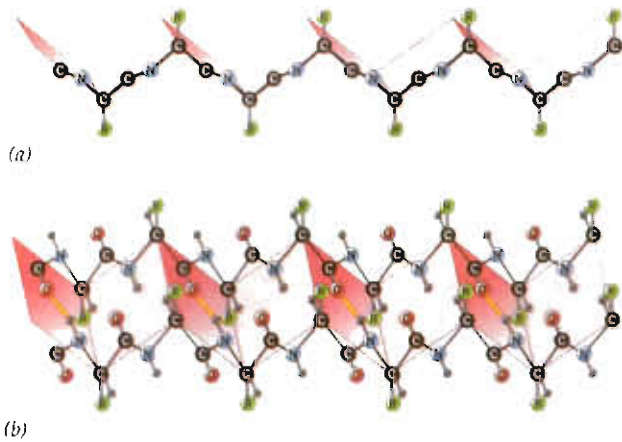


FIGURA 2-31. Lámina β plegada. *a)* Cada polipéptido de una lámina β asume una conformación extendida pero plegada a la cual se le denomina banda β . Los pliegues son resultado de la localización de los carbonos a arriba y abajo del plano de la lámina. Los grupos R sucesivos se proyectan hacia arriba y hacia abajo del esqueleto. *b)* Una lámina β plegada consta de algunas bandas β situadas paralelamente entre sí y reunidas en disposición regular de enlaces hidrógeno entre los grupos carbonilo e imino de esqueletos vecinos. Los segmentos vecinos del esqueleto del polipéptido pueden situarse en posición paralela (en la misma dirección N-terminal $\rightarrow$ C-terminal) o antiparalela (en dirección opuesta N-terminal $\rightarrow$ C-terminal).

polipéptido y los sitios de mayor actividad biológica. En la figura 2-32 se muestran los diferentes tipos de estructura secundaria de la manera más simple; las hélices alfa se representan mediante listones helicoidales, las fibras β se muestran como flechas aplanadas que conectan los segmentos como delgados alambres.

Estructura terciaria. En tanto la estructura secundaria se relaciona principalmente con la conformación de aminoácidos adyacentes en la cadena de polipéptidos, la estructura terciaria describe la conformación de la proteína íntegra. La mayor parte de las proteínas se pueden clasificar según su conformación íntegra como **proteínas fibrosas**, que tienen una forma muy alargada, o **proteínas globulares**, que poseen una forma compacta. La mayor parte de las proteínas que actúan como materiales estructurales fuera de las células vivientes son proteínas fibrosas, como la colágena y la elastina de los tejidos conectivos; la queratina de cabellos, piel y uñas; y la seda. Estas proteínas constan de fibras largas o de hojas aplanadas que resisten fuerzas de tensión o de corte a las cuales están expuestas. Por lo contrario, la mayor parte de las proteínas dentro de las células son proteínas globulares.

Colágena: una abundante proteína fibrosa. La colágena consta de fibras que actúan como cables para resistir las fuerzas de tensión que se desarrollan en los espacios que rodean a las células (analizados ampliamente en la sección 7-1). Se estima que una fibra de colágena de 1 mm de diámetro es capaz de sostener un peso mayor de 10 kilogramos (22 libras). La colágena es un elemento característico de los tejidos conectivos en todo el reino animal y está presente en los vertebrados como uno de los principales componentes

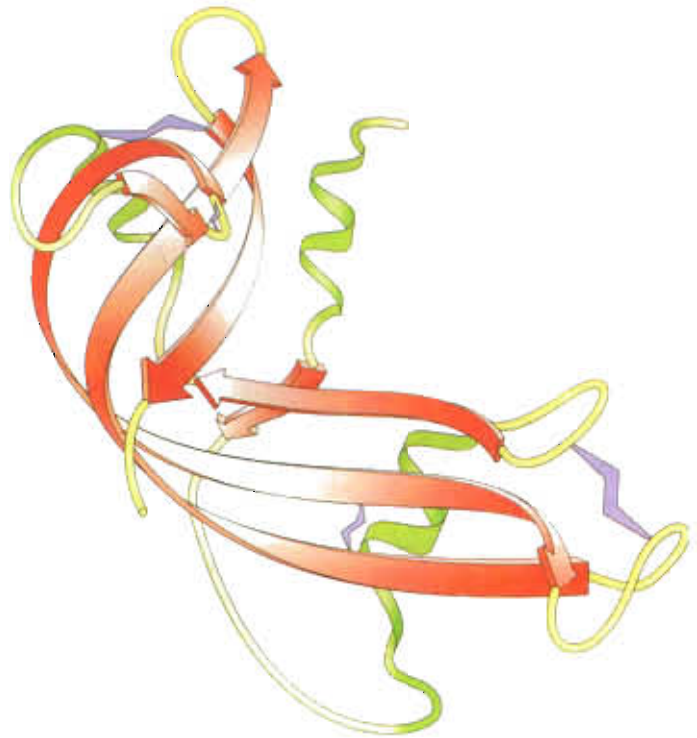


FIGURA 2-32. Modelo de listón de la ribonucleasa. Se muestran las regiones de una hélice α como espirales y bandas β por medio de listones aplanados con flechas que indican la dirección N-terminal $\rightarrow$ C-terminal del polipéptido. (Según un dibujo efectuado por Jane S. Richardson.)

de la piel, cartílago, hueso, tendones y la córnea. Las fibras de colágena son polímeros contruidos a partir de monómeros compuestos de tres cadenas alargadas de polipéptidos helicoidales (llamadas cadenas α) enrolladas sobre sí mismas para formar una triple hélice (fig. 2-33, *a*), muy diferente de una hélice alfa. Los monómeros de colágena se organizan en disposición escaliforme para formar microfibrillas (fig. 2-33, *b*), que a su vez se organizan en fibras de mayor calibre que muestran un patrón característico de bandas en el microscopio electrónico (fig. 2-33, *c*).

La composición de los aminoácidos de las cadenas α de colágena es poco común. Cada cadena tiene casi 1 000 aminoácidos de longitud y la glicina constituye prácticamente cada tercer residuo. Las glicinas se localizan en el punto donde cada cadena gira hacia el borde interno, o sea, donde hay la menor cantidad de espacio disponible para una cadena lateral de aminoácidos. En realidad, la glicina es el único aminoácido que puede adaptarse a la organización triple helicoidal de la colágena.

Hay otras dos características poco comunes de las cadenas α de la colágena: contienen grandes cantidades de prolina, y gran parte de los residuos de prolina y lisina son hidroxilados. Las prolinas son importantes para generar la hélice tipo colágena y los aminoácidos hidroxilados son importantes para mantener la estabilidad de la triple hélice formando puentes hidrógeno de una cadena a otra dentro

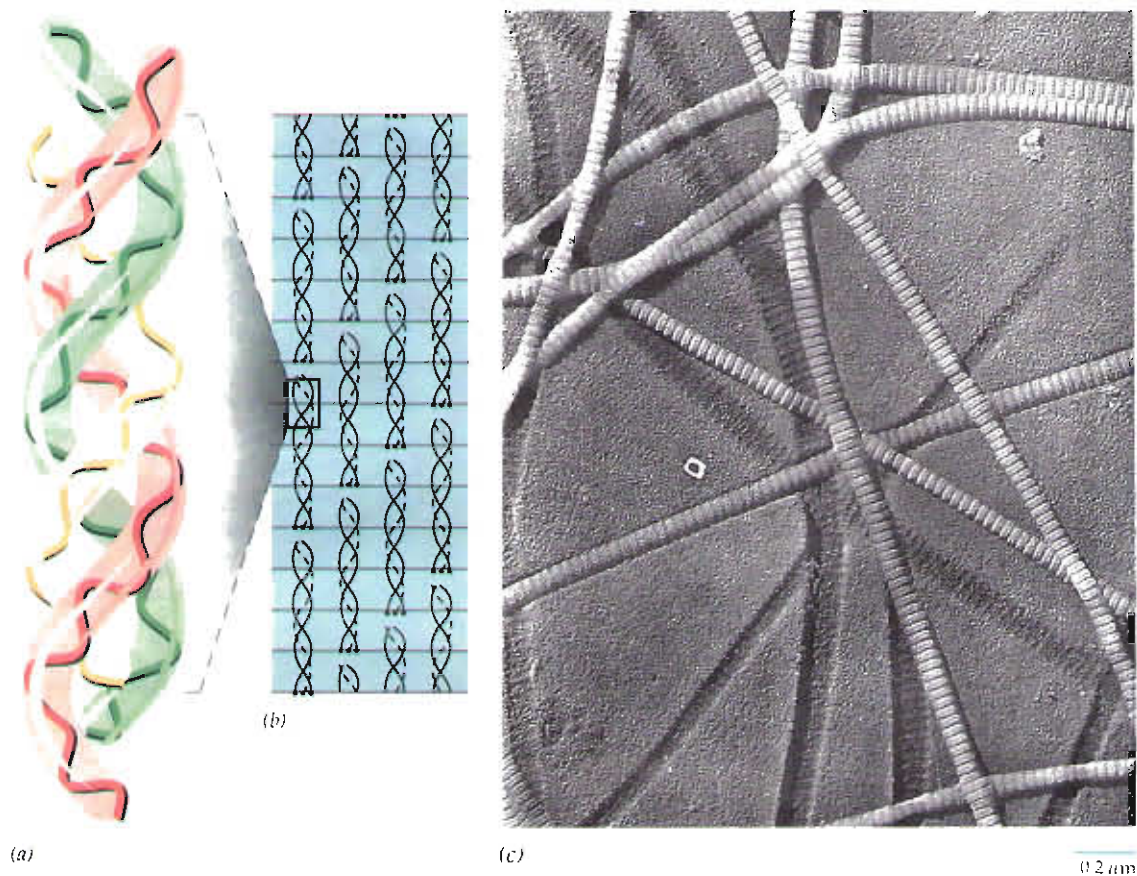


FIGURA 2-33. Colágena, un ejemplo de proteína fibrosa. Esta figura muestra varios niveles de organización de la colágena. *a)* El monómero básico de colágena es una triple hélice compuesta de tres cadenas de polipéptidos helicoidales distintos. *b)* Los monómeros se alinean en filas en las cuales las moléculas de una fila se encuentran escalonadas en relación con las de la fila vecina. *c)* Micrografía electrónica de fibras de colágena humana que muestran su patrón característico de bandas como resultado de la disposición de los monómeros de colágena. Las bandas se repiten a lo largo de la fila con una periodicidad de 64 a 70 nm. (*c)* Cortesía de Jerome Gross y Francis O. Schmitt.)

de un monómero. La hidroxilación de los residuos de prolina y lisina tiene lugar enzimáticamente después que los aminoácidos se han incorporado a la cadena del polipéptido. La falta de hidroxilación de las cadenas de colágena tiene consecuencias graves para la estructura y función de los tejidos conectivos. Esto es evidente en los síntomas del escorbuto, una enfermedad producida por deficiencia de vitamina C (ácido ascórbico), caracterizada por inflamación de las encías y pérdida de los dientes, cicatrización deficiente de las heridas, huesos quebradizos y debilitamiento del revestimiento de los vasos sanguíneos, que provoca sangrado interno. Las enzimas que añaden grupos hidroxilo a los aminoácidos lisina y prolina de la colágena requieren ácido ascórbico como coenzima.

Mioglobina: la primera proteína globular en la cual se determinó la estructura terciaria. A diferencia de las proteínas fibrosas que muestran una estructura muy extendida, las cadenas de polipéptidos de la mayor parte de las proteínas están plegadas y torcidas formando estructuras complejas. Puntos distantes de la secuencia lineal de aminoácidos se aproximan y unen mediante diferentes tipos de enlace. No fue sino hasta 1957 que se dispuso de un modelo

de estructura terciaria para una proteína globular. El trabajo lo realizó John Kendrew y sus colegas, en la Universidad de Cambridge, empleando la proteína mioglobina y con la técnica de **crystalografía de rayos X**. En esta técnica (descrita aquí en la sección 17-8) se bombardea un cristal de la proteína con un delgado haz de rayos X y se permite que la radiación dispersada (difracción) por los átomos de la proteína incida sobre una placa fotográfica donde se forman puntos como los mostrados en la figura 2-34. Según la intensidad y posición de los puntos, un investigador puede trabajar en retrospectiva para deducir la estructura capaz de producir dicho patrón. Cuanto más información se analiza, más detalles se obtienen para describir la molécula.

La mioglobina funciona en el tejido muscular como sitio para almacenar oxígeno; la molécula de oxígeno se une a un átomo de hierro en el centro de un grupo hem. (El grupo hem es un ejemplo de *grupo prostético*, o sea, una parte de la proteína no compuesta de aminoácidos, añadida a la cadena de polipéptidos después de ensamblarse en el ribosoma.) El grupo hem de la mioglobina confiere al tejido muscular su color rojo. La primera publicación, en 1957, acerca de la estructura de la mioglobina suministró un per-

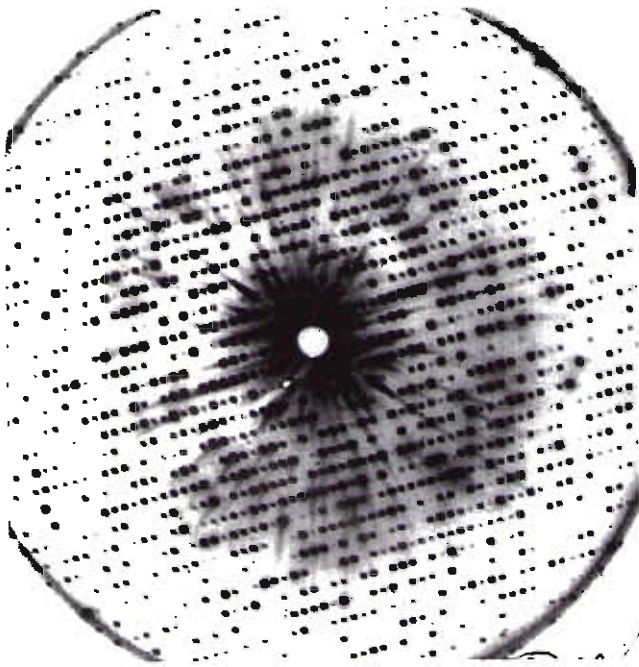


FIGURA 2-34. Patrón de difracción de rayos X de la mioglobina.
(Cortesía de John C. Kendrew.)

fil de baja resolución suficiente para revelar que la molécula era compacta (globular) y que la cadena de polipéptidos estaba doblada sobre sí misma en un arreglo complicado (fig. 2-35, *a*). No se encontraron datos de regularidad o simetría dentro de la molécula. El perfil relativamente burdo de la proteína reveló la presencia de ocho prolongaciones de la hélice α en forma de bastón cuya longitud oscilaba entre 7 y 24 aminoácidos. En conjunto, casi 75% de los 153 aminoácidos de la cadena de polipéptidos se encuentra en la conformación de hélice alfa. Este es un porcentaje inusualmente alto en comparación con el de otras proteínas examinadas hasta ahora. No se encontraron láminas β plegadas.

Análisis subsecuentes de la mioglobina empleando nuevos datos de difracción de rayos X suministraron una descripción mucho más detallada de la molécula (fig. 2-35, *b*). Por ejemplo, se demostró que el grupo hem está situado dentro de una bolsa de grupos R hidrofóbicos que promueven el enlace del oxígeno sin oxidar el átomo de hierro (pérdida de electrones). La mioglobina no contiene enlaces disulfuro; la estructura terciaria de la proteína se mantiene exclusivamente por interacciones no covalentes. Se piensa que todos los enlaces no covalentes (enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos e interacciones hidrofóbicas) observados ocurren entre las cadenas laterales dentro de las proteínas (fig. 2-36). El modelo de mioglobina dibujado en la figura 2-35, *c*, muestra la posición relativa de cada átomo de la molécula. A diferencia de la mioglobina, la mayor parte de las proteínas globulares contienen hélices α y láminas β . Sin embargo, algunas proteínas (como la isomerasa triosa fosfato, mostrada en la figura 2-38, *b*) consta principalmente de láminas β plegadas. Cada proteína tiene una estructura ter-

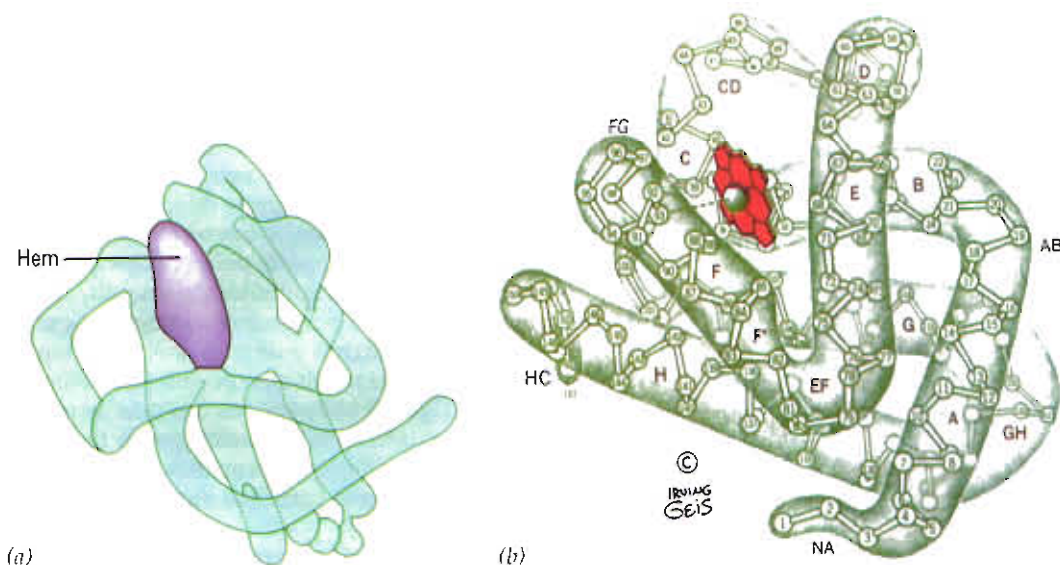
ciaria única que puede correlacionarse con su secuencia de aminoácidos y su función biológica.

Domínios y motivos de las proteínas. Un análisis estructural más reciente ha revelado que muchas proteínas, particularmente las grandes, se componen de dos o más regiones compactas distintas que funcionan de manera semiindependiente. En la mayor parte de los casos, las regiones individuales, o **domínios**, se unen entre sí mediante una porción flexible de la cadena de polipéptidos que sirve como bisagra (fig. 2-37). Los dominios de un polipéptido con frecuencia representan partes que se unen a factores diferentes (como una coenzima y un sustrato), o sólo partes que se mueven de manera relativamente independiente entre sí. Se cree que algunos polipéptidos con más de un dominio se originaron durante la evolución por la fusión de genes que codificaban diferentes proteínas ancestrales, y cada dominio representa una parte que alguna vez fue una molécula separada.

A primera vista, la arquitectura tridimensional de las proteínas parece casi irremediablemente compleja. Sin embargo, conforme se fueron determinando las estructuras terciarias, los bioquímicos descubrieron subestructuras recurrentes, o **motivos**. En la figura 2-38 se muestran dos ejemplos. En la *espiral enrollada* que se encuentra en varias proteínas fibrosas, pares de hélices α se enrollan una sobre otra igual que las dos fibras trenzadas de un cable. Las hélices α que interactúan como espirales enrolladas tienen una estructura primaria distintiva caracterizada por una secuencia de siete aminoácidos repetida regularmente. Los residuos primero y cuarto (denominados *a* y *d*) de la secuencia repetida son hidrofóbicos y se sitúan a un lado de la hélice donde pueden formar interacciones hidrofóbicas con sus contrapartes de la hélice vecina. Es como si una hélice tuviera una fila de "botones" y la otra hélice una fila de "agujeros" en los cuales se pueden introducir los botones. En conjunto, las hélices trenzadas forman una estructura rígida parecida a una barra.

Uno de los motivos más complejos es el barril α/β , originalmente descubierto en la enzima isomerasa triosa fosfato (fig. 2-38, *b*), y desde entonces se ha encontrado en casi 20 enzimas diferentes. Cada una de las ocho duelas del barril consta de una cadena β . Reunidas las ocho cadenas β paralelas forman el barril cerrado que se sitúa en el núcleo de la proteína. El barril se conecta al resto de la proteína por secciones de hélice alfa. Pueden ocurrir motivos comunes en proteínas evolutivamente relacionadas que desempeñan funciones similares o pueden aparecer en proteínas no relacionadas que tienen funciones muy diferentes.

Cambios dinámicos dentro de las proteínas. Las proteínas no son rígidas e inflexibles, más bien poseen gran capacidad de movimiento interno. Los pequeños cambios en la disposición de las uniones dentro de una proteína generan movimiento interno en la molécula que puede captarse mediante simuladores computadorizados (fig. 2-39, *a*). Los estudios de proteínas también revelan la ocurrencia de cambios en los enlaces de hidrógeno, movimientos ondulatorios de las cadenas laterales externas y rotación completa alrededor de una sola unión de los anillos aromáticos de la tirosina y los residuos de fenilalanina. Los movimientos predecibles (no al azar) dentro de una proteína



relacionados con las funciones de la molécula se describen como **cambios de conformación**. Prácticamente toda actividad en la cual participa una proteína se acompaña de cambios de conformación dentro de la molécula. Por ejemplo, en la mioglobina, el O_2 una vez liberado de su sitio de enlace en el grupo hem, sale desde el interior de la proteína y se requiere un cambio de conformación para abrir una vía de salida a la molécula de O_2 . En general, es más fácil estudiar los cambios de conformación empleando un inhibidor parecido a la molécula que normalmente se enlaza a la pro-

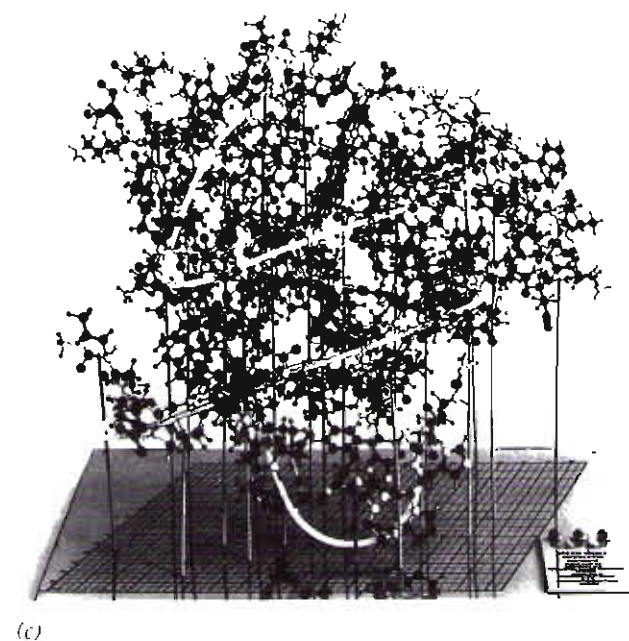


FIGURA 2-35. Estructura tridimensional de la mioglobina de ballena. *a)* Primer modelo relativamente burdo de la proteína basado en los datos de difracción de rayos X a baja resolución. Se observa la conformación general de la molécula, pero hay poca información respecto de los tipos de interacciones entre los residuos de aminoácidos. (En este primer diagrama, el plano del grupo hem es incorrecto.) *b)* Modelo de mioglobina a mayor resolución que en el inciso *a*. Se observa que la mayor parte de los aminoácidos residen dentro de las regiones de la hélice alfa. Las regiones no helicoidales ocupan principalmente los ángulos donde cambia la dirección de la cadena de polipéptido. Se indica la posición del grupo hem. *c)* Modelo físico de la mioglobina que ilustra la enorme complejidad de una proteína. (*b*: Copyright por Irving Geis; *c*: cortesía de J. Kendrew.)

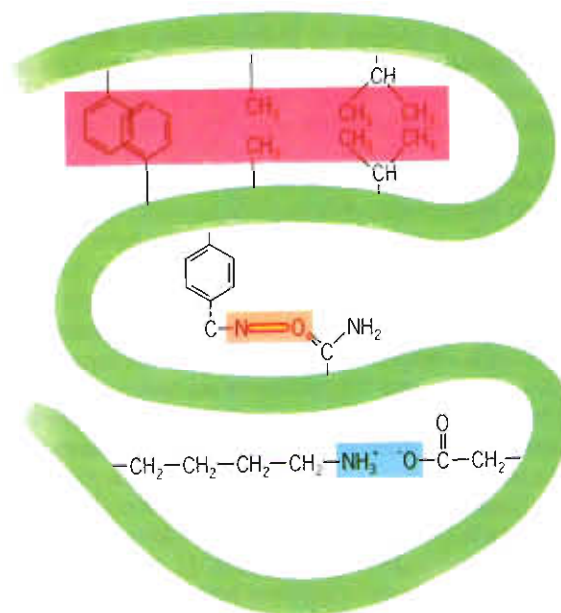
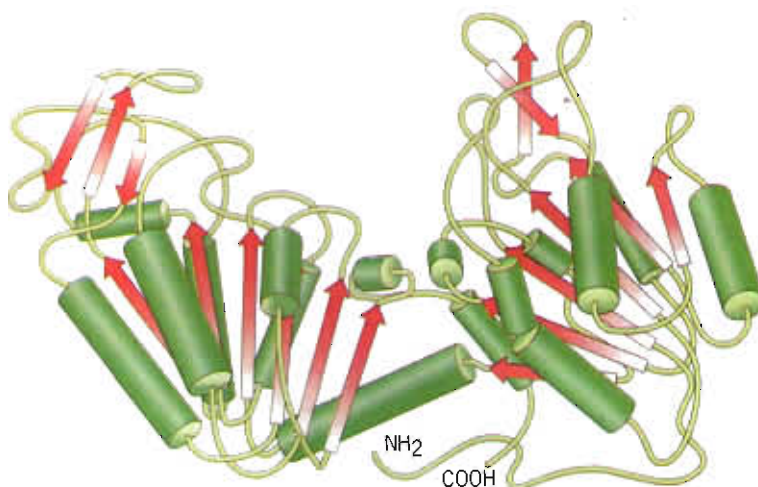


FIGURA 2-36. Tipos de enlace covalente que mantienen la conformación de las proteínas.

FIGURA 2-37. Dominios de una proteína. Dibujo de una fosfogliceratocinasa nativa de músculo de caballo que muestra dos distintos dominios conectados por una bisagra. Las hélices α se definen con cilindros y las fibras β por flechas, que además denotan su dirección. (Según R.D. Banks y cols. Reproducido con permiso de Nature 279:775, 1979. Copyright 1979, Macmillan Magazines Limited.)



teína. Los cambios que ocurren en una molécula de mioglobina durante la unión y liberación de monóxido de carbono, un gas que inhibe el enlace de O_2 , se muestra en la figura 2-39, b. En las figuras 3-14 y 9-39 se muestran otros dos ejemplos de cambios de conformación que ocurren entre las proteínas. La importancia de los cambios de conformación se puede apreciar considerando que los movimientos de nuestro cuerpo son resultado del efecto aditivo de millones de cambios de conformación que tienen lugar entre las proteínas contráctiles de los músculos.

Estructura cuaternaria. Aunque numerosas proteínas, como la mioglobina, se componen de una sola cadena de polipéptidos, muchas otras están formadas por más de una cadena o **subunidad**. Las subunidades pueden unirse mediante enlaces covalentes de disulfuro, pero con mayor frecuencia se mantienen juntas por enlaces no covalentes, como puede ocurrir, por ejemplo, entre las "placas" hidrofóbicas de las superficies de polipéptidos vecinos. Se dice que las proteínas compuestas de subunidades tienen una **estructura cuaternaria**. Según la proteína, las cadenas de polipéptidos pueden ser idénticas o no idénticas. Una proteína compuesta de dos subunidades idénticas se describe como **homodímero**, en tanto que una proteína compuesta de dos subunidades no idénticas es un **heterodímero**. En la figura 2-40, a, se muestra una proteína homodímera representada como un listón. Las dos subunidades de la proteína se presentan con colores diferentes y se indican los residuos hidrofóbicos que forman los sitios de contacto. Una proteína de múltiples subunidades bastante bien estudiada es la hemoglobina, la proteína que transporta O_2 en los eritrocitos. La molécula de la hemoglobina humana consta de dos polipéptidos de globina α y dos polipéptidos de globina β (fig. 2-40, b); cada uno enlaza una sola molécula de oxígeno. Individualmente, cada polipéptido de la globina tiene una estructura terciaria similar a la mioglobina, hecho que apoya la noción de que evolucionaron a partir de un polipéptido ancestral común con una función común, como la de enlazar proteína a O_2 .

Multiproteínas complejas. Aunque la hemoglobina consta de cuatro subunidades, todavía se considera una pro-

teína simple con una sola función. Se conocen muchos ejemplos en los cuales diferentes proteínas, cada una con una función específica, se reúnen físicamente para formar una **multiproteína compleja** mucho más grande. Una de las primeras multiproteínas complejas que se describieron y estudiaron fue la piruvato deshidrogenasa de la bacteria *E. coli*, que consta de 60 cadenas de polipéptidos correspondientes a tres enzimas diferentes (fig. 2-41). Las enzimas

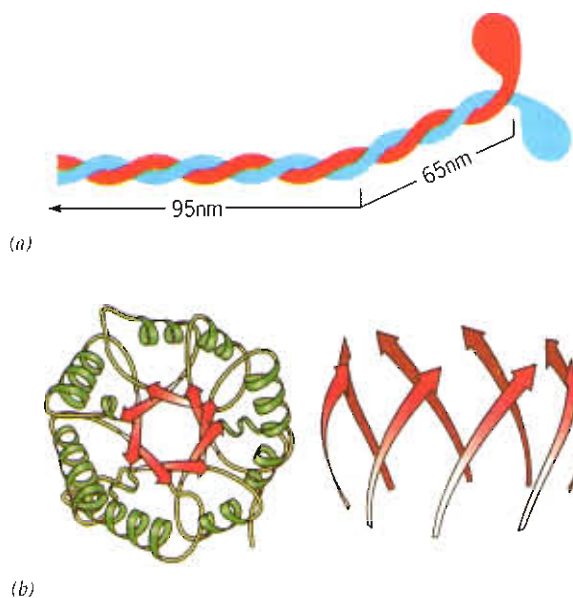
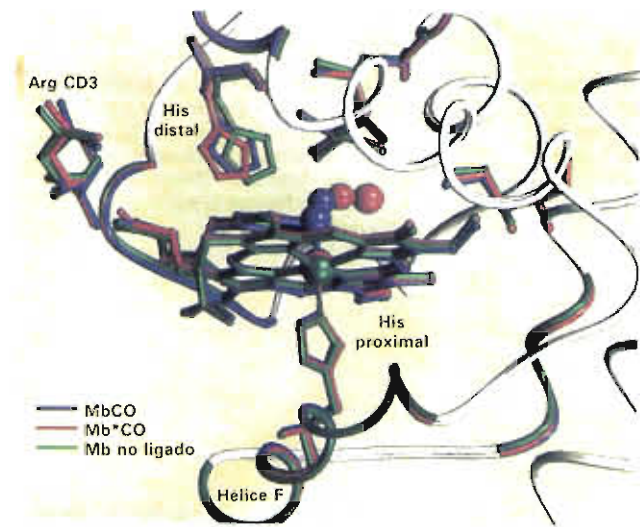


FIGURA 2-38. Motivos de la proteína. a) La espiral enrollada, como se observa en la porción en forma de barra de una molécula de miosina, consta de dos hélices α enrolladas una sobre la otra para formar un dominio en forma de bastón. Esta parte del filamento de miosina desempeña un papel clave en la formación de los filamentos musculares gruesos (sección 9-6). b) Barril α/β de la enzima isomerasa triosa fosfato según se ve desde arriba. El dibujo a la derecha muestra la disposición de las cadenas β en los barriles vistas lateralmente. (b: Según el dibujo de Jane S. Richardson.)



(a)



(b)

FIGURA 2-39. Movimientos dinámicos de una molécula de mioglobina. a) Movimientos internos de la mioglobina simulados por medio de cálculos computadorizados. Se superponen varias "tomas instantáneas" de la molécula calculadas a intervalos de 5×10^{-12} segundos. El esqueleto del polipéptido se muestra en azul, el grupo hem en amarillo y una de las histidinas que juegan un papel crucial en la función de la hemoglobina aparece de color naranja. Se cree que estos tipos de movimientos tienen un papel importante en las actividades de la proteína, incluyendo la entrada y la salida de la molécula de O_2 . b) Sitio activo de una molécula de mioglobina que muestra tres diferentes etapas: 1) con una molécula de monóxido de carbono enlazada al grupo hem de la proteína (azul), 2) en el momento que se libera la molécula de monóxido de carbono (rojo) y 3) con el sitio no ocupado (verde). Las diferencias de conformación entre estos tres estados se notan comparando la posición de los tres colores. Este tipo de imagen se puede captar utilizando cristalografía de rayos X a baja temperatura. (a: Cortesía de Martin Karplus; b: cortesía de Joel Berendzen.)

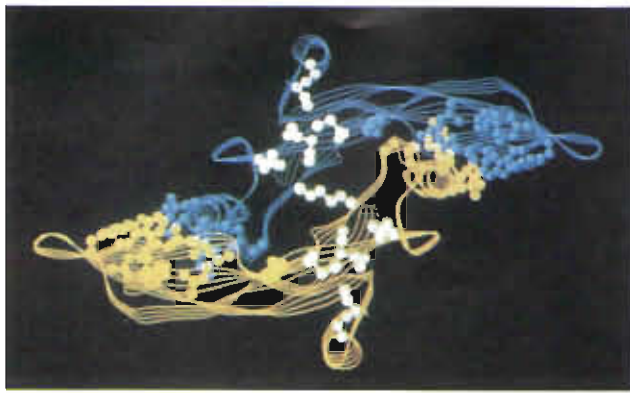
que constituyen este complejo catalizan una serie de reacciones para acoplar dos vías metabólicas, la glucólisis y el ciclo del ácido tricarboxílico (véase fig. 5-8). Debido a que las enzimas están asociadas físicamente, el producto de una enzima se puede orientar directamente a la siguiente enzima de la secuencia sin diluirse en el medio acuoso de la célula.

Las multiproteínas complejas formadas dentro de la célula, como la piruvato deshidrogenasa, no son estructuras necesariamente estables. En realidad, la mayor parte de las proteínas interactúan con otras proteínas en patrones sumamente dinámicos, reuniéndose y separándose en todo momento según las condiciones dentro de la célula. Las proteínas que interactúan tienden a mostrar superficies complementarias. A menudo la prolongación de una molécula se adapta dentro de un agujero sobre su pareja. Una vez que las dos moléculas se ponen en contacto estrecho, su interacción se estabiliza mediante la formación de uniones no covalentes. Estos principios de interacción proteína-proteína se ilustran con los modelos moleculares presentados en la figura 2-42. Conforme se van descubriendo actividades moleculares más y más complejas, cada vez es más evidente la importancia de las interacciones transitorias entre proteínas. Por ejemplo, procesos tan diversos como síntesis de DNA, formación de ATP y procesamiento de RNA son efectuados por complejos que constan de una gran cantidad de proteínas en interacción.

Estructura y función de los anticuerpos

Antes de abandonar el tema de la estructura y función de las proteínas merece consideración especial un último grupo de éstas, las **inmunoglobulinas** o simplemente **anticuerpos**. Los anticuerpos son proteínas solubles producidas por los vertebrados que sirven como arsenal molecular en la guerra del cuerpo contra patógenos invasores. La interacción de los anticuerpos con la superficie de un virus o de una célula bacteriana neutraliza la capacidad del patógeno para infectar una célula huésped y facilita la ingestión de dicho patógeno y su destrucción por los fagocitos errantes. El sistema inmunológico puede producir millones de moléculas de diferentes anticuerpos, que consideradas en conjunto pueden reconocer y unirse a prácticamente todo tipo de sustancia extraña, o **antígeno**, a la cual se puede exponer el cuerpo.

Una de las características más notables de la respuesta inmunológica es su especificidad. Consideremos una proteína común en los mamíferos, como la actina del músculo esquelético. Aunque todos los mamíferos producen esta proteína, su secuencia de aminoácidos varía algo de una especie a otra. Incluso ligeras diferencias de esta proteína entre dos especies diferentes son suficientes para permitir que una preparación activa de músculo de un miembro de una especie sea reconocida como extraña si se inyecta a un miembro de otra especie. Los anticuerpos producidos en respuesta a la inyección son muy específicos; sólo se combi-



(a)

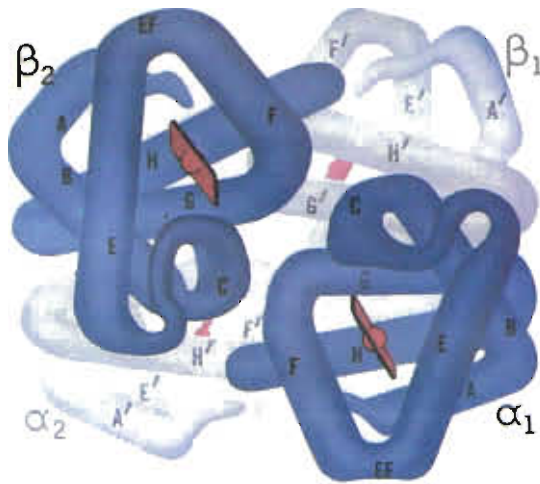


(a)

20 nm

(b)

FIGURA 2-41. Piruvato deshidrogenasa; una multiproteína compleja. a) Micrografía electrónica de un complejo de piruvato deshidrogenasa teñido aislado de *E. coli*. Cada complejo contiene 60 cadenas de polipéptidos que forman tres enzimas diferentes. Su peso molecular se aproxima a cinco millones de daltons. b) Modelo del complejo de piruvato deshidrogenasa. El núcleo del complejo consta de un agrupamiento cuboide de moléculas de dihidrolipoil transacetilasa. El dímero piruvato deshidrogenasa (esferas negras) se distribuye simétricamente a lo largo de las aristas del cubo y los dímeros dihidrolipoil deshidrogenasa (esferas grises pequeñas) se colocan en las caras del cubo. (Cortesía de Lester J. Reed.)



(b)

FIGURA 2-40. Proteínas con estructura cuaternaria. a) Esquema del factor de transformación del crecimiento $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$), una proteína que ocurre como dímero compuesto de dos subunidades idénticas. Las dos subunidades están coloreadas de amarillo y azul, respectivamente. La cadena lateral de cisteína y los enlaces disulfuro se muestran en blanco. Las esferas que aparecen en amarillo y azul son los residuos hidrofóbicos que forman la interfase entre las dos subunidades. b) Esquema de una molécula de hemoglobina que consta de dos cadenas de globina α y dos cadenas de globina β unidas por enlaces no covalentes. Cuando se ensamblan los cuatro polipéptidos de globina en una molécula completa de hemoglobina, la cinética de la unión y liberación de O_2 es muy diferente de la que muestran los polipéptidos aislados. Esto se debe a que la unión del O_2 a un polipéptido provoca un cambio de conformación en los otros polipéptidos que altera su afinidad por las moléculas de O_2 . (a: Reimpreso con permiso de S. Dnopin y cols., *Science* 257:372 1992, cortesía de David R. Davies. Copyright 1992 American Association for the Advancement of Science, b: copyright por Irving Geis.)

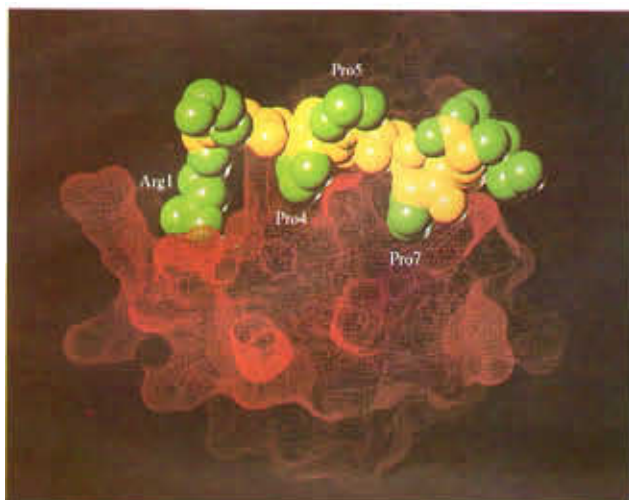
nan con actina y con ningún otro tipo de proteína presente en la solución de prueba.

Los biólogos celulares y moleculares sacan ventaja de la especificidad de los anticuerpos y los emplean como herramienta analítica para identificar proteínas específicas de interés y determinar su localización dentro de la célula. En todo este libro se hace notar el empleo de anticuerpos en

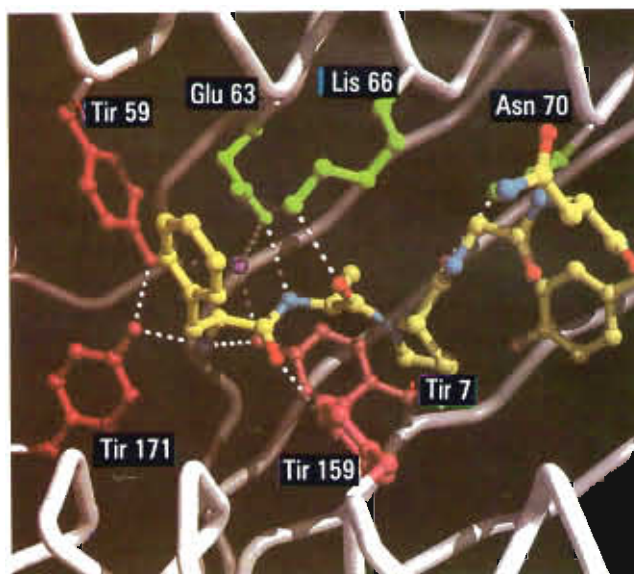
esta búsqueda a través de las fotografías a color que muestran moléculas de anticuerpos dentro de las células unidas mediante enlaces covalentes a colorantes fluorescentes de brillantes colores. En el presente análisis sólo se intentará responder preguntas acerca de las moléculas de anticuerpos. ¿Cómo pueden enlazarse a otras moléculas con tan alto grado de especificidad?

Los anticuerpos están formados por dos tipos de cadenas de polipéptidos, las **cadena pesadas** de mayor tamaño (peso molecular de 50 000 a 70 000 daltons) y las **cadena ligeras** más pequeñas (peso molecular de 23 000 daltons o 23 kD). Los dos tipos de cadenas se reúnen entre sí para formar pares mediante enlaces disulfuro. Se han identificado cinco clases diferentes de inmunoglobulinas (**IgA**, **IgD**, **IgE**, **IgG** e **IgM**). Las diferentes inmunoglobulinas aparecen en distintos momentos luego de la exposición a una sustancia extraña o en diferentes líquidos corporales (cuadro 2-4). Hay dos tipos de cadenas ligeras: cadenas kappa (κ) y cadenas lambda (λ), ambas presentes en las cinco clases de inmunoglobulinas. Por lo contrario, cada tipo de inmunoglobulina tiene su propia cadena pesada única que define dicho tipo. El análisis siguiente se restringe a las IgG que son las inmunoglobulinas más abundantes. Una molécula individual de IgG está compuesta de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas dispuestas como se muestra en la figura 2-43, y se describe a continuación.

Para determinar la base de la especificidad de los anticuerpos fue necesario establecer la secuencia de aminoácidos de algunos anticuerpos específicos. Normalmente, el primer paso para lograr este objetivo sería purificar las proteínas particulares que van a formar la secuencia. Sin embargo, en condiciones normales es imposible obtener una preparación purificada del anticuerpo específico a partir de la sangre debido a que cada individuo produce un gran número de diferentes moléculas de anticuerpos de estruc-



(a)



(b)

FIGURA 2-42. Interacciones proteína-proteína. a) Modelo que ilustra las superficies moleculares complementarias de porciones de proteína que interactúan entre sí. La molécula de color rojo es un dominio de la enzima fosfatidilinositol 3-OH cinasa, cuyas funciones se analizan en el capítulo 15. Este dominio se une específicamente a una variedad de péptidos que contienen prolina, como el que se muestra en el modelo de espacio lleno en la parte superior de la figura. Se indican los residuos de prolina del péptido que ocupan las bolsas de la superficie de la enzima. El esqueleto del péptido presenta color amarillo y las cadenas laterales color verde. b) Vista ampliada de los tipos de interacción no covalente que ocurren entre dos péptidos que poseen superficies complementarias. Las líneas punteadas indican enlaces de hidrógeno formados: 1) entre residuos de aminoácidos en las dos proteínas y 2) entre residuos de aminoácidos y una molécula de agua (esfera de color magenta) que se colocan entre los dos péptidos. (a: Tomado de Hongato Yu y cols., *Cell* 76:940, 1994, con permiso de copyright de Cell Press; b: reimpresso con permiso de Masazumi Matsumura y cols., *Science* 257:930, 1992, cortesía de Ian A. Wilson. Copyright 1992 American Association for the Advancement of Science.)

tura muy similar, lo bastante para impedir su separación. El problema se resolvió al descubrir que la sangre de pacientes que sufren un tipo de cáncer linfóide, denominado mieloma, contiene gran cantidad de una sola especie de anticuerpo.

Como se describe en el capítulo 16, el cáncer es una enfermedad monoclonal; o sea, las células del tumor se originan a partir de la proliferación de una sola célula descariada. Puesto que un solo linfocito *normalmente* sólo produce una especie molecular de anticuerpo, el paciente con mieloma múltiple produce grandes cantidades del anticuerpo específico sintetizado por la célula particular malignizada. Aunque un paciente individual sólo produce una especie de anticuerpo, diferentes pacientes dan lugar a diferentes anticuerpos. Como resultado, los investigadores pudieron purificar cantidades sustanciales de varios anticuerpos procedentes de diversos pacientes y comparar sus secuencias de aminoácidos. Pronto se reveló un patrón importante. Se observó que la mitad de cada cadena kappa ligera (110 aminoácidos en el extremo amino del polipéptido) era constante en la secuencia de aminoácidos de todas las cadenas kappa, en tanto que la otra mitad variaba de un paciente a otro. De manera similar, la comparación de las secuencias de aminoácidos de varias cadenas lambda procedentes de diferentes pacientes reveló que también constaban de una sección de secuencia constante y una sección cuya secuencia variaba de una inmunoglobulina a la siguiente. Las cadenas pesadas de IgG purificadas también contenían una porción variable (V) y una constante (C).

Aunque casi la mitad de cada cadena ligera constaba de una región variable (V_L), sólo una cuarta parte de cada cadena ligera era variable (V_H) entre diferentes pacientes; los restantes tres cuartos de la cadena pesada (C_H) eran constantes para todas las IgG. La porción constante de la cadena pesada se puede dividir en tres secciones de longitud aproximadamente igual claramente homólogas entre sí (fig. 2-43). Parecería que cada una de las tres secciones de la parte C de la cadena pesada IgG (y también de las cadenas pesadas de las otras clases de Ig y las porciones C de ambas cadenas ligeras kappa y lambda) se originaran durante la evolución por duplicación de un gen ancestral que codificaba para una unidad Ig de unos 110 aminoácidos. También se piensa que las regiones variables (V_H o V_L) se originaron por evolución de la misma unidad Ig ancestral. Los análisis estructurales indican que cada una de las unidades homólogas de una cadena ligera o pesada se pliega independientemente para formar su propio dominio compacto. Los dos dominios de una cadena ligera se muestran en la figura 2-44. En la molécula IgG intacta, cada uno de los dominios de las cadenas ligeras se relaciona con uno de los dominios de las cadenas pesadas, como se muestra en la figura 2-43.

Un examen más estrecho de los polipéptidos de las inmunoglobulinas revela que las porciones variables de las cadenas ligeras y pesadas contiene subregiones especialmente variables, o sea *hipervariables*, de una molécula de anticuerpo a otra (marcadas Hv en la figura 2-44). Las porciones hipervariables de las cadenas contienen delecciones e inserciones de aminoácidos y también sustituciones de un aminoácido por otro. Las cadenas ligeras y pesadas contienen ambas tres fragmentos hipervariables.

CUADRO 2-4. Tipos de inmunoglobulinas humanas

Tipo	Cadena pesada	Cadena ligera	Peso molecular (kD)	Propiedades
IgA	α	κ o λ	360-720	Presente en lágrimas, moco nasal, leche materna, secreciones intestinales
IgD	δ	κ o λ	160	Presente en varias membranas plasmáticas celulares; función desconocida
IgE	ϵ	κ o λ	190	Se enlaza a casi todas las células; libera histamina, causa de reacciones alérgicas
IgG	γ	κ o λ	150	Anticuerpos solubles primarios de origen sanguíneo; atraviesan la placenta
IgM	μ	κ o λ	950	Presente en membranas plasmáticas de células B, media la respuesta inmunológica inicial; activa el complemento microbicida

La especificidad de la molécula de un anticuerpo particular es determinada por los aminoácidos presentes en los dos sitios para combinación de antígenos situados en los extremos de la molécula en forma de Y (fig. 2-43). Los dos sitios de combinación de una molécula IgG son idénticos y cada uno se forma por la asociación de la porción variable de una cadena ligera con la porción variable de una cadena pesada a la cual está unida. La construcción de anticuerpos a partir de pares de cadenas ligeras y pesadas permite a un individuo producir una tremenda variedad de anticuerpos a partir de un número relativamente moderado de polipéptidos diferentes. Por ejemplo, si hay 1 000 cadenas ligeras diferentes y 1 000 cadenas pesadas distintas, se puede formar un millón ($10^3 \times 10^3$) de anticuerpos diferentes, cada uno con un sitio distinto para combinarse con un antígeno.

El sitio de combinación de una molécula de anticuerpo tiene una estructura estereoquímica complementaria a la del antígeno al cual se va a enlazar. Como sería de esperar, las porciones hipervariables de cada cadena desempeñan

un papel prominente en la formación de la superficie del sitio de combinación y explican el mayor grado de especificidad que pueden mostrar las poblaciones de anticuerpos. La figura 2-45 muestra la naturaleza precisa de la interacción entre un antígeno particular y un anticuerpo, según se puede determinar mediante estudios de difracción de rayos X. El análisis de la estructura de los sitios para combinación de diferentes anticuerpos revela una gran variedad de formas y tamaños, todas originadas en diferencias de conformación de las regiones hipervariables de cadenas ligeras y pesadas. Los dominios variables de un anticuerpo determinan la especificidad del sitio de combinación de la molécula, en tanto que los dominios constantes proporcionan un marco estructural para toda la molécula y también efectúan una gran variedad de importantes funciones efectoras. Estas incluyen fijación del anticuerpo en la membrana plasmática, activación del sistema de complemento mediante el cual las células bacterianas son puncionadas y destruidas, paso de anticuerpos a través de la placenta del feto en desarrollo y estimulación de la proliferación de linfocitos.

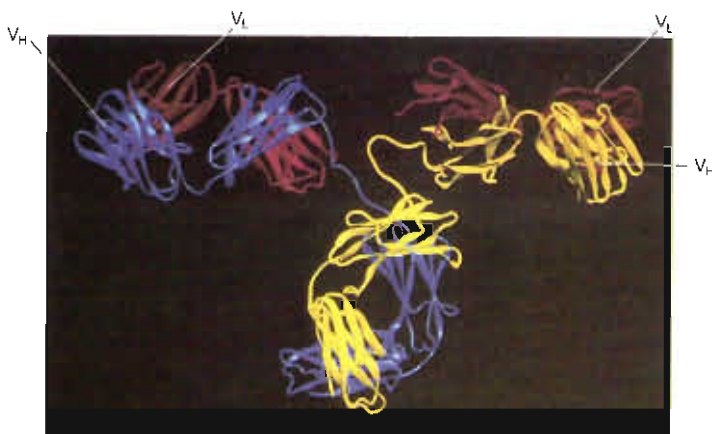


FIGURA 2-43. Estructura de un anticuerpo. Este modelo en forma de listón de una molécula de IgG muestra que contiene cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Una de las cadenas pesadas se muestra en azul, la otra en amarillo, en tanto que ambas cadenas ligeras se muestran en rojo. Los dominios de cada cadena (dos por cadena ligera y cuatro por cadena pesada) son evidentes. Las regiones variables de una cadena ligera y de una pesada (dominios V_L y V_H) se juntan en la porción N-terminal de los dos polipéptidos, formando un sitio para combinar antígenos. Cada molécula de IgG tiene dos sitios de combinación que poseen estructuras idénticas. (Cortesía de Alexander McPherson.)

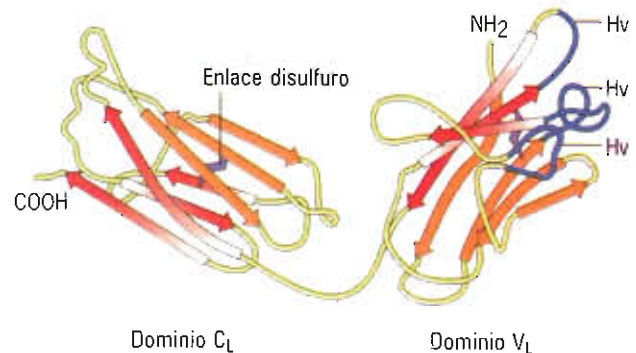


FIGURA 2-44. Dominios de un anticuerpo. Dibujo esquemático de una cadena ligera lambda humana sintetizada por las células de un paciente con mieloma múltiple. El polipéptido sufre un plegamiento, de modo que las porciones constante y variable se presentan en dominios separados. Las flechas gruesas representan fibras β ensambladas en láminas β . Cada dominio tiene dos láminas β que se pueden distinguir por los colores rojo y naranja. Los tres segmentos hipervariables (H_v) de la cadena se agrupan en un extremo de dominio variable que forma parte del sitio para la combinación del antígeno en anticuerpo. (Según Marianne Schiffer y cols., reimpresso con permiso de Biochemistry 12:4628, 1973. Copyright 1973, American Chemical Society.)

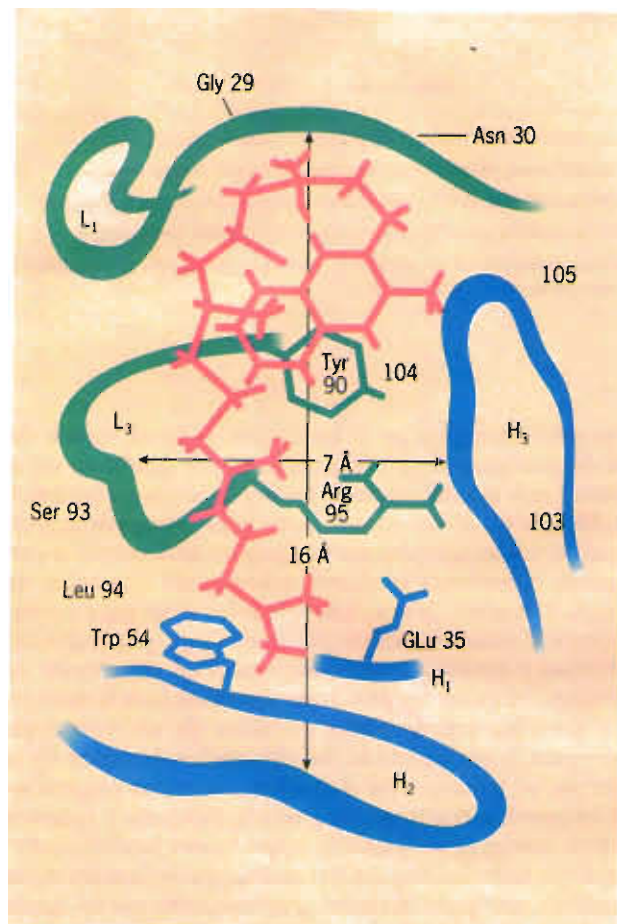


FIGURA 2-45. Interacción antígeno-anticuerpo. Dibujo esquemático de un derivado de vitamina K₁ (color naranja) unido a la región para combinación de una molécula de IgG. L₁ y L₃ indican el lugar aproximado de las regiones hipervariables primera y tercera de la cadena ligera. H₁, H₂ y H₃ indican las regiones hipervariables de la cadena pesada. (Según L. M. Anzel y cols., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71:1429, 1974.)

Ingeniería de proteínas

Los avances en biología molecular permitieron diseñar y producir en masa nuevas proteínas diferentes de las sintetizadas por los organismos vivos. Con las técnicas actuales para sintetizar DNA es posible crear un gen artificial que se puede emplear para producir proteínas que tengan una secuencia deseada de aminoácidos. El problema reside en saber cuál de todas las posibles proteínas, entre una variedad prácticamente infinita, se podría manufacturar que tuviera alguna función útil. Por ejemplo, consideremos una compañía de biotecnología que quiere manufacturar una proteína que se enlace a la superficie del virus del SIDA para eliminarlo de una solución acuosa o del torrente sanguíneo. Asumiendo que un programa de simulación en computadora puede predecir la forma que debe tener tal proteína para enlazarse a la superficie del virus, ¿qué secuencia de aminoácidos se debe reunir para producir dicha proteína? La respuesta requiere un conocimiento detallado de las reglas

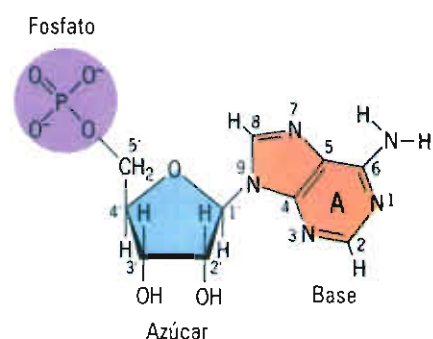
que gobiernan la relación entre estructura primaria y estructura terciaria de una proteína.

En años recientes se lograron grandes avances en la síntesis de genes artificiales cuyos productos péptidos pueden plegarse en estructuras secundarias relativamente simples, como haces de hélices α o láminas β . Sin embargo, los intentos para crear una estructura más compleja de polipéptidos a partir de la inicial son mucho más difíciles. Otra manera de conocer el estado actual de conocimiento de las proteínas por parte de los bioquímicos es suministrarles la secuencia primaria de una proteína cuya estructura terciaria esté a punto de conocerse y permitirles que hagan predicciones respecto del aspecto tridimensional que tendrá dicha proteína; luego se pueden comparar las predicciones con la verdadera estructura. Hasta ahora, estas predicciones no han sido muy precisas, lo cual sirve para recordarnos el alto nivel de complejidad de las proteínas y nuestra limitada comprensión de la manera como la naturaleza transforma un mensaje genético lineal en una proteína funcional tridimensional.

Un método alternativo para la producción de nuevas proteínas es modificar las producidas por las células. Avances recientes en la tecnología del DNA han permitido a los investigadores aislar un gen individual de los cromosomas humanos, alterar su contenido de información en forma precisa y luego sintetizar la proteína modificada con la secuencia de aminoácidos alterada. Esta técnica, a la cual se denomina **mutagénesis dirigida al sitio**, tiene gran variedad de usos, tanto en investigación básica como en biología aplicada. Por ejemplo, si un investigador desea saber el papel de un residuo particular en el plegamiento de un polipéptido, se puede mutar al gene de manera que sustituya a un residuo con diferencias de carga, características hidrofóbicas o propiedades para formar enlaces de hidrógeno, y a continuación se puede determinar la capacidad del polipéptido modificado para lograr su estructura terciaria normal. Como veremos a lo largo de este libro, la mutagénesis dirigida al sitio es una invaluable herramienta en el análisis de las funciones específicas de partes mínimas de casi todas las proteínas de interés biológico.

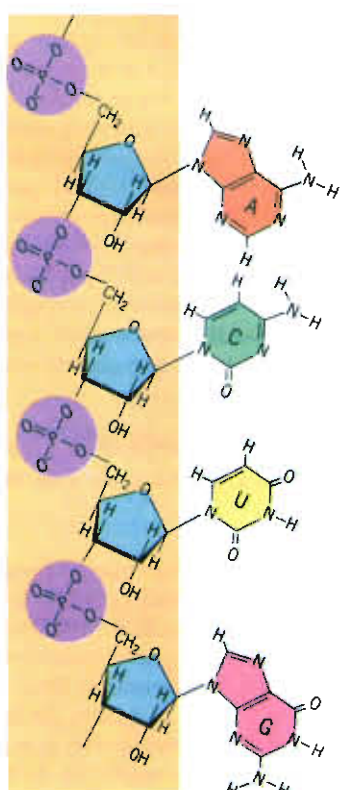
Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son macromoléculas construidas en forma de cadena larga (*hebra*) de monómeros llamados **nucleótidos**. La función principal de los ácidos nucleicos es almacenar y transmitir información genética, pero también pueden desempeñar funciones estructurales o catalíticas. Hay dos tipos de ácidos nucleicos en los organismos vivos, **ácido desoxirribonucleico (DNA)** y **ácido ribonucleico (RNA)**. Como se mencionó en el capítulo 1, el DNA es el material genético de todos los organismos celulares y el RNA efectúa este papel para muchos virus. En las células, la información almacenada en la plantilla de DNA se emplea para dirigir las actividades celulares durante la formación de mensajes de RNA. En el presente análisis describiremos la estructura básica de los ácidos nucleicos empleando el RNA como molécula representativa. En el capítulo 10 se describirá la estructura más compleja de la doble cadena



(a)

Esqueleto de fosfato de azúcar



(b)

FIGURA 2-46. Nucleótidos y fibras de nucleótido. a) Los nucleótidos son los monómeros a partir de los cuales se construyen las cadenas de ácidos nucleicos. Un nucleótido consta de tres partes: un azúcar, una base nitrogenada y un fosfato. Los nucleótidos de RNA contienen el azúcar ribosa que posee un grupo hidroxilo enlazado al segundo átomo de carbono. En contraste, los nucleótidos de DNA contienen el azúcar desoxirribosa, que tiene un átomo de hidrógeno en vez de un grupo hidroxilo fijado al segundo átomo de carbono. Cada nucleótido está polarizado, tiene un extremo 5' (correspondiente al lado 5' del azúcar) y un extremo 3'. b) Los nucleótidos se reúnen para formar cadenas mediante enlaces covalentes que unen al grupo hidroxilo 3' de un azúcar con el grupo fosfato 5' del azúcar adyacente.

de DNA, donde se puede vincular con su papel central en las bases químicas de la vida.

En una cadena de RNA cada nucleótido consta de tres partes (fig. 2-46, a); 1) un azúcar de cinco carbonos, ribosa;

2) un grupo fosfato, y 3) una base nitrogenada (así llamada porque en los anillos de su molécula se encuentran átomos de nitrógeno). El fosfato está unido al carbono 5' del azúcar y la base nitrogenada se junta al carbono 1' de los azúcares. Durante el ensamblado de una cadena de ácido nucleico, el grupo hidroxilo fijado al carbono 3' del azúcar de un nucleótido queda unido mediante una unión éster al grupo fosfato unido al carbono 5' del siguiente nucleótido de la cadena. Así, los nucleótidos de una cadena de RNA (o DNA) están conectados por enlaces azúcar-fosfato (fig. 2-46, b), que se describen como enlaces 3'-5'-fosfodiéster debido a que el átomo de fosfato está esterificado con los dos átomos de oxígeno, uno de cada azúcar adyacente.

Una cadena de RNA (o de DNA) contiene cuatro tipos diferentes de nucleótido que se distinguen por su base nitrogenada. Dos tipos de bases se encuentran en los ácidos nucleicos; pirimidinas y purinas (fig. 2-47). Las **pirimidinas** son moléculas más pequeñas que constan de un solo anillo; las **purinas** son más grandes y poseen dos anillos. El RNA contiene dos diferentes purinas, **adenina** y **guanina**, y dos pirimidinas diferentes, **citocina** y **uracilo**. En el DNA, el uracilo se sustituye por **timina**, una pirimidina con un grupo metilo extra pegado al anillo (fig. 2-47).

En condiciones típicas el RNA consta de una sola cadena, pero a menudo se pliega para formar moléculas con extensos segmentos de doble cadena. Esto lo ilustra el RNA presente dentro de una subunidad pequeña del ribosoma bacteriano (fig. 2-48). Los RNA ribosómicos son moléculas que no contienen información genética; más bien sirven como armazones estructurales sobre las cuales pueden unirse las proteínas del ribosoma y como elementos que se fijan a diferentes componentes solubles requeridos para la síntesis de proteínas. Un RNA ribosómico de subunidad grande actúa como catalizador en la reacción para unir aminoácidos mediante enlaces covalentes durante la síntesis de proteínas. Los RNA catalizadores se denominan **ribosomas**, y

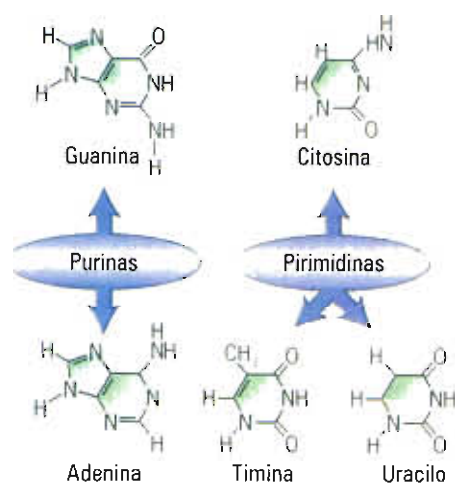


FIGURA 2-47. Bases nitrogenadas en los ácidos nucleicos. De las cuatro bases estándar que se encuentran en el RNA, adenina y guanina son purinas y uracilo y citosina son pirimidinas. En el DNA, las pirimidinas son citosina y timina, que difieren del uracilo por un grupo metilo unido al anillo.

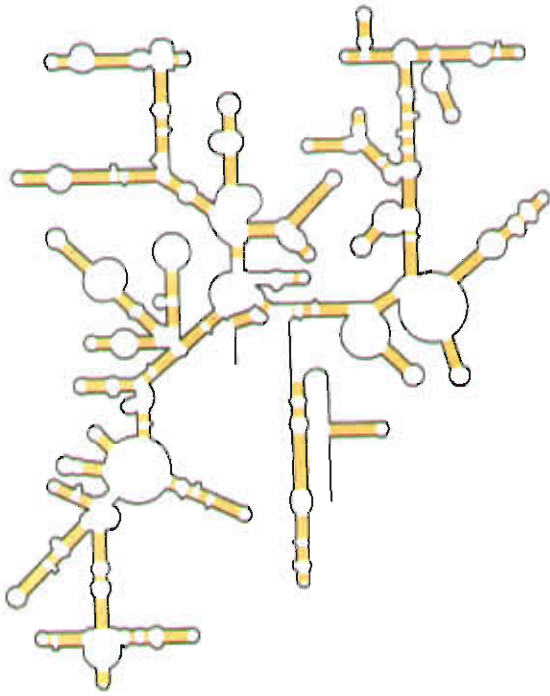


FIGURA 2-4B. El RNA puede asumir formas complejas, como la ilustrada en el RNA ribosómico aquí mostrado, el cual es un componente integral de la subunidad ribosómica más pequeña. La cadena de RNA se pliega sobre sí misma en un patrón muy ordenado, de modo que la mayor parte de la molécula forma una doble cadena. Las sombras de color naranja indican regiones donde dos porciones de la cadena se enlazan entre sí por un enlace de hidrógeno.

en *La vía experimental* del capítulo 11 se estudian en detalle su estructura y función.

Los nucleótidos no sólo son elementos importantes para construir ácidos nucleicos, sino que también tienen funciones significativas por sí mismos. La mayor parte de la energía utilizable por todo organismo viviente en cualquier momento se deriva del nucleótido **trifosfato de adenosina (ATP)**. La estructura del ATP y su papel clave en el metabolismo celular se estudian en el siguiente capítulo.

Un mundo de RNA

En los últimos 50 años los estudios de investigación han revelado notables avances en diferentes tipos de proteínas, y la importancia del DNA como almacén y para controlar la actividad de las células. Por lo contrario, el RNA ha sido relegado principalmente a un papel de mensajero, un intermediario del flujo de información genética procedente del DNA (a través del RNA) hacia las proteínas. Este concepto cambió en los últimos años cuando se supo que en el ribosoma el RNA se encarga de unir aminoácidos para formar un polipéptido y es también el RNA de las partículas nucleares el que probablemente se encargue de cortar y unir los mensajes genéticos. Estos datos llevaron a especular que en algún momento, en las primeras etapas de la evolución biológica, no existían sobre el planeta ni DNA ni proteínas. En vez de ellos, las moléculas de RNA efectuaban una doble tarea; servían como material genético y catalizaban las

reacciones enzimáticas necesarias. Sólo en una etapa posterior de la evolución se “encargaron” estas actividades al DNA y a las proteínas (véase sección 11-3).

2-6 Formación de estructuras macromoleculares complejas

Como se describe en *La vía experimental* al final de este capítulo, mediante varios estudios se ha establecido que la compleja estructura tridimensional de una proteína puede formarse en forma espontánea por autoensamblado o con ayuda de un pequeño número de “chaperones” inespecíficos presentes en la célula. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos de una proteína es el determinante primario de la forma tridimensional final de la proteína.

¿Hasta qué grado se pueden aplicar los conocimientos adquiridos del estudio de la arquitectura de proteínas a estructuras más complejas en la célula? Estructuras como membranas, ribosomas y elementos citoesqueléticos que constan de diferentes tipos de subunidades, ¿también pueden ensamblarse por sí solas? ¿Hasta qué punto se puede explicar la organización subcelular simplemente colocando pedazos unidos para formar el arreglo más estable? El ensamblado de los organelos celulares todavía es mal comprendido, pero de los siguientes ejemplos se puede concluir que diferentes tipos de subunidades son capaces de autoensamblarse para formar arreglos de orden más elevado.

Ensamblado de las partículas virales del mosaico del tabaco y de sus subunidades ribosómicas

La prueba más convincente de que un proceso particular de ensamblado puede ser autodirigido es demostrar que bajo condiciones fisiológicas puede ocurrir fuera de la célula (*in vitro*) cuando las únicas macromoléculas presentes son aquellas que constituyen la estructura final. En 1955, Heinz Fraenkel-Conrat y Robley Williams, de la Universidad de California en Berkeley, demostraron que las partículas del VMT, que constan de una molécula de RNA larga (unos 6 600 nucleótidos) arrollados dentro de una cápsula helicoidal formada por 2 130 subunidades proteínicas idénticas tenían capacidad de autoensamblarse. En sus experimentos purificaron proteínas del VMT y de RNA por separado, las mezclaron bajo condiciones adecuadas y recuperaron partículas infecciosas maduras luego de un breve periodo de incubación. Aunque la secuencia de hechos que conducen al ensamblado del VMT fue motivo de controversia en años recientes, hay poco desacuerdo acerca de que los dos componentes contienen toda la información necesaria para la formación de partículas.

Los ribosomas, como las partículas del VMT, se forman de RNA y proteínas. A diferencia del VMT más simple, los ribosomas contienen varios tipos diferentes de RNA y un conjunto considerable de diferentes proteínas. Todos los ribosomas, cualquiera que sea su origen, se componen de dos subunidades de diferente tamaño. Aunque los ribosomas en general se consideran estructuras simétricas, en realidad

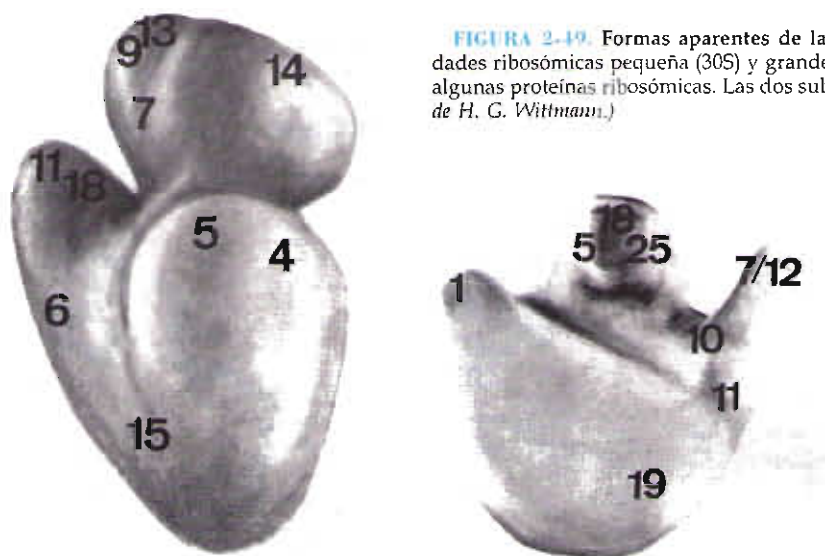


FIGURA 2-49. Formas aparentes de las subunidades ribosómicas. Modelos de las subunidades ribosómicas pequeña (30S) y grande (50S) de la bacteria *E. coli* mostrando la ubicación de algunas proteínas ribosómicas. Las dos subunidades no se muestran en la misma escala. (Cortesía de H. G. Wittmann.)

tienen una forma muy irregular, como se indica en la figura 2-49. La unidad ribosómica grande (o 50S) de *E. coli* contiene dos moléculas de RNA y 32 proteínas diferentes. La subunidad ribosómica pequeña (o 30S) contiene una molécula de RNA y 21 proteínas diferentes.

Uno de los acontecimientos fundamentales en el estudio de los ribosomas ocurrió a mediados del decenio de 1960, cuando Masayasu Nomura y sus colaboradores, de la Universidad de Wisconsin, lograron reconstituir subunidades 30S completas y totalmente funcionales mezclando las 21 proteínas purificadas de la subunidad pequeña con RNA ribosómico purificado del mismo tipo de subunidad. Al parecer, los componentes de la subunidad pequeña contienen completa la información necesaria para ensamblar toda la partícula. El análisis de los intermediarios que se forman en diferentes etapas de la reconstrucción *in vitro* indica que el ensamblado de la subunidad ocurre de manera secuencial, paso a paso, muy parecido al proceso *in vivo*. Este ensamblado del VMT sugiere que la incorporación de proteínas individuales parece modificar la conformación de la partícula en crecimiento haciéndola más reactiva a la fijación de proteínas adicionales. Cuando menos una de las proteínas de la subunidad pequeña (S16) parece funcionar exclusivamente en el ensamblado del ribosoma; la delección

de esta proteína en la mezcla de reconstitución disminuye mucho la tasa del proceso de ensamblado, pero no bloquea la formación de los ribosomas funcionales completos. Muchas otras proteínas de la subunidad pequeña funcionan principalmente para estabilizar la estructura ensamblada. La reconstitución de una subunidad grande del ribosoma bacteriano se logró en el decenio siguiente.

Debe recordarse que en tanto la reconstitución *in vitro* del ribosoma tarda aproximadamente dos horas a 50°C, la bacteria puede ensamblar la misma estructura en unos pocos minutos a temperaturas tan bajas como 10°C. Puede ser que la bacteria utilice "trucos" especiales no disponibles al investigador que inicia con componentes purificados. Por ejemplo, la formación del ribosoma dentro de la célula puede incluir la participación de factores accesorios que funcionan en el plegamiento de la proteína como los chaperones descritos en la página 72. En realidad, la formación de ribosomas dentro de una célula *eucariota* implica la asociación transitoria de varias proteínas que no terminan en la partícula final y también la eliminación de casi la mitad de los nucleótidos del precursor de RNA ribosómico grande (sección 11-3). Como resultado, los componentes del ribosoma *eucariota* maduro ya no poseen la información para reconstituirse por sí mismos *in vitro*.

LA VIA EXPERIMENTAL

Construcción de la estructura de una proteína

A fines del decenio de 1950 se dilucidó la estructura terciaria de la mioglobina al demostrar la complejidad de la arquitectura de las proteínas. De inmediato se originó una pregunta importante: ¿cómo puede una estructura tan compleja, plegada y retorcida, organizarse en la célula? En 1958, Francis Crick sugirió que "el plegamiento simplemente es una función del orden de los aminoácidos".¹ En otras palabras, una vez que se sintetiza un polipéptido a partir de una secuencia particular de aminoácidos codificados en el DNA, el polipéptido se pliega espontáneamente en su organización tridimensional apropiada. Como se analiza en el siguiente capítulo, los acontecimientos tienden a progresar hacia estados de menor energía. Según la hipótesis de Crick, la estructura terciaria particular que adopta un polipéptido es la que posee la menor energía y confiere a la estructura la mayor estabilidad. La primera prueba de esta hipótesis fue realizada por Christian Anfinsen y sus colegas en los National Institutes of Health al usar la proteína ribonucleasa A.

La ribonucleasa A es una pequeña enzima que consta de una sola cadena de polipéptidos de 124 aminoácidos con cuatro enlaces disulfuro que unen varias partes de la cadena (fig. VE 2-1). Como era imposible aislar cadenas de ribonucleasa antes que sufriera su plegamiento dentro de la célula, Anfinsen tuvo que seguir el siguiente método. Purificó la enzima activa a partir de células, a continuación trató la proteína con agentes capaces de destruir las estructuras secundaria y terciaria del polipéptido, y luego estudió la capacidad de la proteína para restablecer su conformación activa (nativa). El desplegamiento o desorganización de una proteína se denomina **desnaturalización** y se puede efectuar mediante varios agentes, incluyendo detergentes, solventes orgánicos, radiaciones, calor y compuestos como la urea y el cloruro de guanidina, los cuales bloquean diferentes interacciones que estabilizan la estructura terciaria de una proteína. Para desnaturalizar la ribonucleasa Anfinsen trató primero la molécula con β -mercaptoetanol, agente reductor que rompe los puentes disulfuro y los convierte en grupos sulfhidrilo ($-SH$) de cisteína; y con urea concentrada capaz de romper enlaces no covalentes. Juntos estos agentes pueden desorganizar por completo la proteína. Una vez eliminados el mercaptoetanol y la urea, Anfinsen observó que las moléculas activas de la enzima se reconstruyeron (fig. VE 2-1), moléculas estructural y funcionalmente indistinguibles de las presentes al principio del experimento.² Anfinsen concluyó que la secuencia de aminoácidos de un polipéptido contiene toda la información requerida para ensamblar la conformación tridimensional de las proteínas, y por lo tanto el proceso de plegamiento ocurre por **autoensamblado**.

La conclusión de que el replegamiento de la ribonucleasa ocurre por autoensamblado se apoya en la presunción de que la urea provoca desorganización total de la proteína, lo cual es imposible de verificar. Si el polipéptido retiene un mínimo de

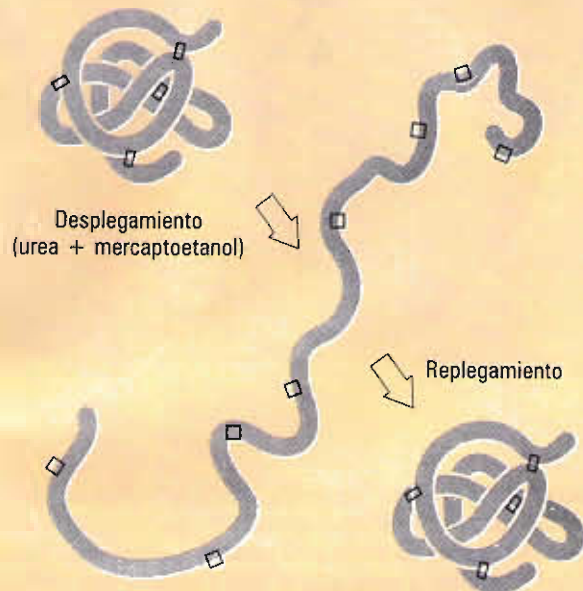


FIGURA VE 2-1. Una molécula nativa de ribonucleasa (con enlaces disulfuro intramoleculares) es reducida y desplegada con β -mercaptoetanol y urea M8. Luego de eliminar estos reactivos la proteína sufre replegamiento espontáneo. (Tomado de C.J. Epstein, R.F. Goldberger y C.B. Anfinsen, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28:439, 1963.)

orden en presencia de la urea, podría argüirse que eso facilita el replegamiento de la molécula después de quitar el agente desnaturalizador. Posteriormente se confirmó la capacidad de la ribonucleasa para autoensamblarse con la demostración de que la ribonucleasa se puede sintetizar en el laboratorio, aminoácido por aminoácido, y que el producto sintetizado todavía tiene capacidad para plegarse sobre sí mismo y producir una molécula de enzima activa.³

Cuando Anfinsen y otros investigadores intentaron ampliar sus observaciones a otras proteínas lograron resultados mixtos.⁴ Algunos polipéptidos desnaturalizados se volvieron a plegar a sus conformaciones nativas, otros no. Incluso las proteínas que se autoensamblaron, lo hicieron mucho más lentamente de lo que ocurre dentro de la célula. Además, el autoensamblado ocurrió mucho más extensamente cuando la proteína estaba presente en concentración mucho menor (0.01 a 0.1 mg/ml) y temperaturas más bajas que las observadas en la célula. Anfinsen concluyó que la concentración y temperatura menores reducían la probabilidad de formación de agregados moleculares interactivos. Aunque el plegamiento de los polipéptidos fue menos eficaz en el tubo de ensaye que en la célula, los resultados de estos estudios sugieren fuertemente

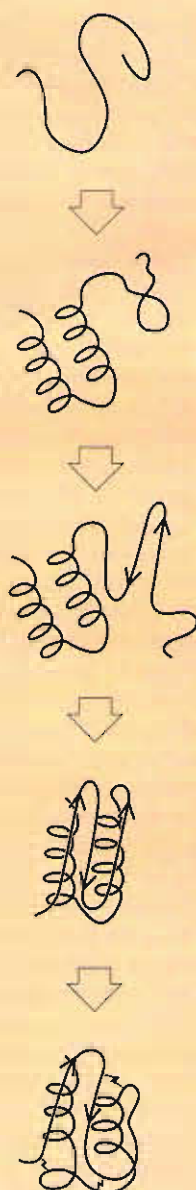


FIGURA VE 2.2. Etapas propuestas en el proceso de plegamiento de una proteína. Los segmentos enrollados representan una hélice α y las flechas representan fibras β . (Según Jane S. Richardson, Adv. Prot. Chem. 34:326, 1981.)

que la estructura terciaria de un polipéptido puede originarse de manera espontánea a partir de su estructura primaria.

En los últimos 30 años se han publicado cientos de trabajos acerca de las vías de plegamiento de proteínas. En un polipéptido determinado de 100 aminoácidos hay más de 1 000 enlaces que pueden girar y los cálculos indican que si el plegamiento ocurre de manera totalmente al azar, podría requerirse mayor tiempo que la edad del universo en la búsqueda de todas las conformaciones posibles. Claramente, debe haber alguna dirección ("abreviaturas" moleculares) para el proce-

so. Los estudios de Jane Richardson y sus colegas, en la Universidad de Duke, y de otros indican que el proceso de plegamiento ocurre en pasos ordenados (fig. VE 2-2) con formación de intermediarios bien definidos.⁵ Una vez que se logra un intermediario plegado aparecen guías que dirigen el proceso hacia la siguiente etapa intermedia y por lo tanto eliminan la necesidad de probar muchas conformaciones inestables. El proceso puede compararse a caminar por una playa rocosa o subir una cuesta empinada. A cada paso la persona busca una roca plana o un apoyo firme que lo guíe hacia el siguiente sitio.

Las primeras etapas del plegamiento generan, en condiciones típicas, gran parte de la estructura secundaria de la proteína, las hélices α y las láminas β , que forman una armazón estable para los pasos subsecuentes. Se piensa que durante la evolución se seleccionaron secuencias de aminoácidos que forman con mayor rapidez a estos intermediarios relativamente estables. El plegamiento subsecuente de la mayor parte de las proteínas solubles se guía por interacciones hidrofóbicas que obligan a los residuos no polares a juntarse en el núcleo central de la proteína formando una molécula compacta estabilizada por fuerzas de van der Waals. El último paso, cuando se requiere, es la formación de puentes disulfuro. Durante el decenio de 1980 se lograron nuevos conocimientos en el proceso de plegamiento dependientes de los resultados obtenidos a partir de una línea de investigación inesperada.

En 1962, el biólogo italiano F.M. Ritossa estudiaba el desarrollo de la mosca de la fruta *Drosophila* y publicó un dato curioso.⁶ Cuando la temperatura a la cual se desarrollaban las larvas de la mosca de la fruta se elevaba de los 25°C normales a 32°C, se activaban algunos sitios nuevos en los cromosomas gigantes de las larvas. Como veremos en el capítulo 10, los cromosomas gigantes de las larvas de estos insectos suministran una manera de visualizar la expresión del gen. Los resultados sugieren que el incremento de temperatura induce la expresión de nuevos genes, dato que se confirmó 10 años más tarde con la caracterización de varias proteínas nuevas presentes en la larva luego de elevar la temperatura.⁷ Pronto se observó que esta respuesta, denominada **respuesta al choque de calor**, no se limita a la mosca de la fruta, sino que también puede iniciarse en muchas otras células diferentes de prácticamente cualquier tipo de organismo, desde bacterias hasta plantas y mamíferos.⁸ Un examen más detenido reveló que las proteínas caracterizadas no sólo se encontraban en las células sometidas al choque de calor, sino también en concentración menor en células bajo condiciones normales. ¿Cuál es la función de estas proteínas por choque de calor?

La estructura de muchas proteínas es muy sensible a la temperatura; una ligera elevación de temperatura puede iniciar el desdoblamiento de estas proteínas. Este desdoblamiento expone residuos hidrofóbicos previamente ocultos en el núcleo de la proteína. Igual que las moléculas de grasa en un plato de sopa se reúnen en gotas, lo mismo ocurre a proteínas con placas hidrofóbicas en su superficie. Cuando se somete una célula al choque de calor, las proteínas solubles tienden a desnaturalizarse y formar agregados. En 1985 se publicó un trabajo donde se demostraba que luego de la elevación de la temperatura penetraba al núcleo de las células afectadas un tipo de proteínas de choque de calor y se enlazaban a los agre-

gados de proteínas nucleares, donde actuaban como “pata de cabra molecular” que favorece la disgregación.⁹ Estudios adicionales indican que las proteínas producidas por el choque de calor funcionan durante el proceso normal de plegamiento enlazándose a las placas hidrofóbicas expuestas sobre la superficie de intermediarios parcialmente plegados, evitando su agregación. Debido al papel auxiliar de estas proteínas en el proceso de plegamiento para evitar interacciones indeseables, se les denominó **chaperones moleculares**.¹⁰

Se han descrito diferentes tipos de chaperones moleculares, y se ha demostrado que actúan en secuencias muy parecidas a un equipo de relevos. Un tipo de chaperón se une a un polipéptido conforme se sintetiza sobre el ribosoma; luego el polipéptido pasa a otro tipo de chaperón que lo protege durante la siguiente etapa de plegamiento. La molécula chaperón



FIGURA VE 2-3. Modelo de uno de los dos anillos del complejo GroEL. Cada anillo se compone de siete subunidades. Las hélices α se muestran en azul, la fibras β en verde y los segmentos de conexión en naranja. La proteína forma un cilindro hueco, según se indica en la siguiente figura. (Tomado de K. Braig y cols., *Nature* 371:589, 1994, cortesía de Paul B. Sigler. Copyright 1994, Macmillan Magazines Limited.)

mejor estudiada se denomina GroEL y se encuentra en el citoplasma de la bacteria *E. coli*; una proteína homóloga denominada hsp60 se observó en mitocondrias y cloroplastos. Las células bacterianas que poseen un mutante GroEL no funcional carecen de varias actividades enzimáticas. Estas enzimas se sintetizan en los ribosomas de la célula, pero son incapaces de plegarse en la forma nativa, requisito para lograr un estado activo.¹¹

GroEL es un complejo molecular enorme de 14 subunidades idénticas de polipéptidos dispuestos en dos anillos apilados que recuerdan una “dona doble”. La determinación de la estructura tridimensional GroEL reveló que en cada anillo se agrupan 7 subunidades que rodean una cavidad central (fig. VE 2-3).¹² Se cree que en el proceso de plegamiento las proteínas de las etapas intermedias quedan secuestradas dentro de la cavidad central para evitar un plegamiento erróneo o que se unan a otras proteínas. Una vez dentro de la cavidad GroEL, los polipéptidos parcialmente plegados pueden sufrir ciclos alternados entre dos estados: enlazados a las paredes de la cámara y libres dentro del espacio de la cámara (fig. VE 2-4). Cada vez que el polipéptido se libera de las paredes de la cámara presumiblemente avanza otro paso hacia su conformación final. Cuando concluyen los pasos de plegamiento, el polipéptido pierde su capacidad para enlazarse a la pared de la cámara y abandona el complejo GroEL.

Puesto que los chaperones moleculares como GroEL sólo suministran el ambiente para el plegamiento del polipéptido y no poseen información indispensable para el proceso, todavía el plegamiento de un polipéptido se considera “autoensamblado”. Los chaperones moleculares no sólo ayudan al autoensamblado, sino que también participan en desplazar proteínas a través de las membranas para colocarlas en su posición apropiada dentro de organelos específicos, como mitocondrias y cloroplastos.¹³ Dado que los mismos chaperones pueden facilitar el plegamiento de una gran variedad de polipéptidos, se presume que los intermediarios parcialmente plegados deben compartir características comunes que les permiten enlazarse a los mismos chaperones. Una vez que la proteína asume su conformación final, estos sitios de enlace al parecer se ocultan en el interior de la proteína y ésta pierde su capacidad de interactuar de nuevo con un chaperón.

SINOPSIS

Los enlaces covalentes juntan átomos para formar moléculas. Los enlaces covalentes son estructuras estables formadas cuando los átomos comparten los electrones de su capa externa, y cada participante gana una capa llena. Los enlaces covalentes pueden ser simples, dobles o triples según el número de pares de electrones compartidos. Si los electrones en el enlace son compartidos de manera desigual por los átomos que forman los electrones, el átomo con mayor atracción por electrones (el más electronegativo) posee carga parcial negativa, en tanto que el otro átomo posee carga parcial positiva. Las moléculas sin enlaces polarizados tienen carácter no polar o hidrofóbico que las hace insolubles en agua. Las moléculas con enlaces polarizados tienen carácter polar o hidrofílico que las

hace hidrosolubles. Las moléculas polares de importancia biológica contienen uno o más átomos electronegativos, de ordinario O, N, S o P (p. 31).

Débiles fuerzas de atracción forman enlaces no covalentes dentro de la misma molécula o entre dos moléculas cercanas entre regiones con carga positiva y negativa. Los enlaces no covalentes desempeñan un papel clave para conservar la estructura de las moléculas biológicas y mediar sus actividades dinámicas. Los enlaces no covalentes incluyen enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. Los enlaces iónicos se forman entre grupos con carga positiva y negativa; los enlaces de hidrógeno se establecen entre un átomo de hidró-

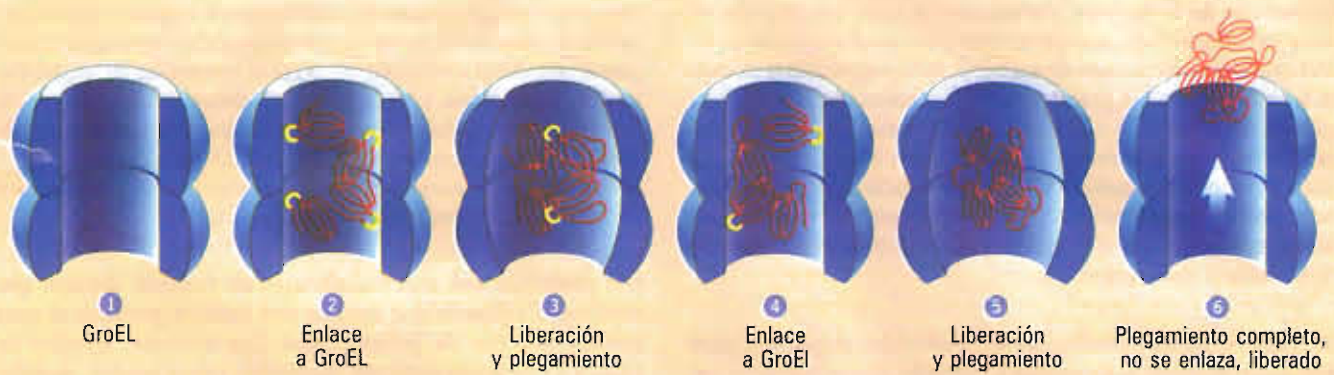


FIGURA VE 2-4. Modelo esquematizado de las etapas del plegamiento de una proteína que pueden ocurrir dentro del complejo GroEL. Los segmentos amarillos del polipéptido representan secuencias de residuos hidrofóbicos expuestos sobre el polipéptido parcialmente plegado. Placas hidrofóbicas de este tipo pueden actuar como sitios de enlace para otros polipéptidos parcialmente plegados, lo que conduce a la formación de agregados. Esto se puede evitar mediante interacciones entre estos sitios y la pared interna de la cámara del GroEL. Durante su estancia en la cavidad GroEL, el polipéptido parcialmente plegado puede alternar entre dos estados: enlazado a la pared de la cámara y libre. Se piensa que estos cambios en las propiedades de enlace del GroEL son resultado de cambios de conformación provocados por hidrólisis de ATP. El plegamiento producido por la internalización de las placas hidrofóbicas ocurre por pasos durante los periodos en que el polipéptido se libera de la pared de la cámara. Se puede notar que otra proteína llamada GroES (no mostrada) a veces se enlaza a la parte de arriba o de abajo de GroEL y excluye la cámara durante el proceso de plegado.

BIBLIOGRAFIA

1. Crick, F.H.C. 1958. On protein synthesis. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 13:138-163.
2. Anfinsen, C.B. y cols. 1961. The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 47:1309-1314.
3. Gute, B. y Merrifield, R.B. 1969. Total synthesis of an enzyme with ribonuclease A activity. *J. Am. Chem. Soc.* 91:501-502.
4. Epstein, C.J., Goldberger, R.F. y Anfinsen, C.B. 1963. The genetic control of tertiary protein structure: Studies with model systems. *Cold Spring Harbor. Symp.* 28:439-449.
5. Richardson, J.S. 1981. The anatomy and taxonomy of protein structure. *Adv. Prot. Chem.* 34:167-339.
6. Ritossa, F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18:571-573.
7. Tissieres, A., Mitchell, H.K. y Tracy, U.M. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosomal puffs. *J. Mol. Biol.* 84:389-398.
8. Kelley, P.M. y Schlesinger, M.J. 1978. The effect of amino acid analogues and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts. *Cell* 15:1277-1286.
9. Lewis, M.J. y Pelham, H.R.B. 1985. Involvement of ATP in the nuclear and nucleolar functions of the 70KD heat-shock protein. *EMBO J.* 4:3137-3143.
10. Ellis, J. 1987. Proteins as molecular chaperones. *Nature* 328:378-379.
11. Horwich, A. y cols. 1993. Folding in vivo of bacterial cytoplasmic proteins: Role of GroEL. *Cell* 74:909-917.
12. Braig, K. y cols. 1994. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* 371:578-586.
13. Manning-Krieg, U.C., Sherer, P.E. y Schatz, G. 1991. Sequential action of mitochondrial chaperones in protein import into the matrix. *EMBO J.* 10:3273-3280.

geno unido mediante enlace covalente (con carga parcial positiva) y un átomo de nitrógeno o de oxígeno unido mediante enlace covalente (con carga parcial negativa); las fuerzas de van der Waals se ejercen entre dos átomos con carga transitoria debido a asimetría momentánea en la distribución de los electrones que rodean a los átomos. Moléculas no polares o porciones no polares de moléculas más grandes en medios acuosos tienden a juntarse para establecer interacciones hidrofóbicas. Ejemplos de diferentes tipos de interacciones no covalentes incluyen la asociación de DNA y proteínas mediante enlaces iónicos, el agrupamiento de cadenas pares de DNA a través de enlaces de hidrógeno y la formación de un núcleo hidrofóbico en proteínas solubles como resultado de interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals (p 33).

El agua posee propiedades únicas de las cuales depende la vida. Los enlaces covalentes para constituir una molécula de agua están muy polarizados. Como resultado, el agua es un excelente solvente capaz de formar enlaces de hidrógeno prácticamente con toda molécula polar. El agua también es un determinante principal de la estructura de las moléculas biológicas y de los tipos de interacciones en las cuales participan. El pH de una solución es una medida de la concentración de iones hidrógeno (o hidronio). La mayor parte de los procesos biológicos son muy sensibles a pH porque los cambios en la concentración de ion hidrógeno alteran el estado iónico de las moléculas biológicas. Las células están protegidas de las variaciones de pH por amortiguadores, compuestos que reaccionan con iones hidrógeno o hidroxilo (p 37).

Los átomos de carbono desempeñan un papel clave en la formación de moléculas biológicas. Cada átomo de carbono tiene capacidad para enlazarse hasta con otros cuatro átomos, incluyendo otros átomos de carbono. Esta propiedad le permite formar moléculas grandes cuyo esqueleto consiste en una cadena de átomos de carbono. Las moléculas que sólo contienen hidrógeno y carbono se denominan hidrocarburos. La mayor parte de las moléculas de importancia biológica contienen grupos funcionales que incluyen uno o más átomos electronegativos que hacen a la molécula más polar, más hidrosoluble y más reactiva (p. 39).

Algunas moléculas biológicas son moléculas pequeñas; otras son macromoléculas formadas a partir de elementos de construcción más pequeños. Las macromoléculas constituyen el material de un organismo y efectúan las funciones requeridas. Casi todas las macromoléculas son polímeros contruidos por unión de subunidades monómeras en cadenas largas. Las macromoléculas se descomponen por hidrólisis (p. 41).

Las moléculas biológicas son miembros de cuatro familias distintas: carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Los carbohidratos incluyen azúcares simples y moléculas más grandes (polisacáridos) contruidos con monómeros de azúcar. La función primaria de los carbohidratos es almacenar energía química y servir como material de construcción durable para estructuras biológicas. Los azúcares biológicos simples constan de un esqueleto de tres a siete átomos de carbono, cada carbono se une a un grupo hidroxilo, excepto uno que posee un grupo carbonilo. Los azúcares con cinco o más átomos de carbono pueden formar moléculas en forma de anillo mediante autorreacción. Los átomos de carbono situados a lo largo del esqueleto del azúcar unidos a cuatro grupos diferentes son sitios de estereoisomerismo y generan pares de isómeros que no pueden superponerse. El carbono asimétrico más alejado del carbonilo determina si el azúcar es D o L. Los azúcares se unen entre sí mediante enlaces glucosídicos para formar disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. En animales, el azúcar se almacena principalmente como glucógeno, un polisacárido ramificado que constituye una fuente de energía rápidamente disponible. En las plantas, las reservas de glucosa se almacenan como almidón, una mezcla de amilosa no ramificada y amilopectina ramificada. La mayor parte de los azúcares, tanto en el glucógeno como en el almidón, están juntos por uniones $\alpha(1\rightarrow4)$. La celulosa es un polisacárido estructural elaborado por células vegetales que constituye el principal componente de la pared celular. En la celulosa, los monómeros de la glucosa se juntan mediante uniones $\beta(1\rightarrow4)$, que pueden romperse por acción de la celulosa, enzima ausente en casi todos los animales. La quitina es un polisacárido estructural compuesto de monómeros de N-acetilglucosamina (p. 44).

Los lípidos corresponden a diversos arreglos de moléculas hidrofóbicas que poseen estructura y funciones muy diferentes. Las grasas constan de una molécula de glicerol esterificado que forma tres ácidos grasos. Los ácidos grasos difieren en la longitud de la cadena, número y posición de los dobles enlaces (sitios de insaturación). Las grasas son muy ricas en energía química; un gramo de grasa contienen más del doble

de la energía que un gramo de carbohidratos. Los esteroides son un grupo de lípidos que contienen un esqueleto de hidrocarburos característico de cuatro anillos. Los esteroides incluyen el colesterol y también numerosas hormonas (p. ej., testosterona, estrógenos y progesterona) sintetizadas a partir de colesterol. Los fosfolípidos son moléculas de lípidos que contienen fosfato, tanto en su extremo hidrofóbico como en el hidrofílico y desempeñan un papel vital en la estructura y función de las membranas celulares (p. 49).

Las proteínas son macromoléculas de función diversa que contienen aminoácidos unidos por enlaces peptídicos para formar cadenas de polipéptidos. Los diversos arreglos de proteínas incluyen enzimas, materiales estructurales, receptores de membrana, factores reguladores de genes, hormonas, agentes de transporte y anticuerpos. El orden en el cual se pueden incorporar los 20 aminoácidos diferentes a una proteína está codificado en la secuencia de nucleótidos del DNA. Los 20 aminoácidos comparten una organización estructural común que consiste en un carbono α unido a un grupo amino, un grupo carboxilo y un grupo R de estructura variable. En el presente esquema, los grupos R se clasifican en cuatro categorías: con carga neta a pH fisiológico; polares sin carga pero capaces de formar enlaces de hidrógeno; no polares que interactúan a través de fuerzas de van der Waals, y tres aminoácidos (prolina, cisteína y glicina) con propiedades únicas (p. 50).

La estructura de una proteína se puede describir en cuatro niveles de complejidad creciente. La estructura primaria es descrita por la secuencia de aminoácidos de un polipéptido; la estructura secundaria correspondiente al arreglo tridimensional (conformación) de las secciones de un esqueleto de polipéptidos; la estructura terciaria dada por la conformación de todo el polipéptido, y la estructura cuaternaria que corresponde al arreglo de las subunidades si la proteína consta de más de una cadena de polipéptidos. La hélice α y la lámina plegada β son estables, y la máxima estabilidad se observa en estructuras secundarias unidas con enlaces de hidrógeno comunes en muchas proteínas. La estructura terciaria de una proteína es muy compleja y única para cada tipo individual de proteína. La mayor parte de las proteínas poseen una forma globular en la cual el polipéptido se pliega para formar una molécula compacta con residuos específicos situados estratégicamente para permitir a la proteína efectuar su función específica. El análisis de un gran número de proteínas revela que muchas contienen dominios que les confieren independencia estructural y funcional (p. 54).

Las actividades de las proteínas se acompañan de cambios de conformación. Algunos movimientos se pueden clasificar como vibraciones moleculares al azar, en tanto que otros son cambios dirigidos en la posición relativa entre grupos particulares de la proteína (p. 62).

Los ácidos nucleicos son moléculas principalmente de información que constan de cadenas de nucleótidos monómeros. Cada nucleótido en una cadena consta de un azúcar, fosfato y base nitrogenada. Los nucleótidos están unidos por enlaces entre los grupos hidroxilo 3' del azúcar de un nucleótido y el

grupo fosfato 5' del nucleótido adyacente. El RNA y el DNA están ensamblados a partir de cuatro nucleótidos diferentes; los nucleótidos se distinguen por sus bases, que pueden ser una pirimidina (citósina o uracilo/timina) o una purina (adenina o guanina). El DNA es una cadena doble de ácido nucleico, y el RNA por lo general es una cadena única, aunque a menudo la cadena única se pliega sobre sí misma para formar secciones de doble cadena. En los ácidos nucleicos, la información está codificada en la secuencia específica de nucleótidos que componen una cadena (p. 66).

La información requerida para que una cadena de polipéptidos adopte su conformación nativa está codificada en la estructura primaria. Algunas proteínas adoptan su conformación final por sí mismas, otras requieren la ayuda de chaperones inespecíficos. Algunos complejos macromoleculares, como VMT y las subunidades ribosómicas de las bacterias, también son capaces de autoensamblado, como se puede observar en experimentos con partículas funcionalmente activas que pueden reconstituirse a partir de mezclas de componentes purificados (p. 68).

PREGUNTAS DE REPASO

1. Describir algunas de las propiedades que distinguen a los enlaces covalentes de los no covalentes.
2. ¿Por qué las moléculas polares, como las del azúcar de mesa, se disuelven con facilidad en el agua? ¿Por qué se forman gotas de grasa sobre la superficie de una solución acuosa? ¿Por qué el sudor enfría al cuerpo?
3. Si se añade ácido clorhídrico al agua, ¿cuál es el efecto sobre la concentración de ion hidrógeno? ¿sobre el pH? ¿sobre la carga iónica de cualquier proteína en la solución?
4. ¿Qué propiedades del átomo de carbono son cruciales para la vida?
5. ¿Qué macromoléculas son polímeros? ¿Cuál es la estructura básica de cada tipo de monómero? ¿Cómo varían entre sí los diferentes monómeros de cada tipo de macromolécula?
6. Describir la estructura de los nucleótidos y cómo se juntan estos monómeros para formar una cadena de polinucleótidos. ¿Por qué sería sumamente simplista describir el RNA como un ácido nucleico de una sola cadena?
7. ¿Cuál es la relación entre una base y su ácido conjugado?
8. Los átomos de oxígeno tienen ocho protones en su núcleo. ¿Cuántos electrones tienen? ¿Cuántos orbitales se encuentran en la capa más interna de electrones? ¿Cuántos electrones hay en la capa externa? ¿Cuántos electrones más puede contener la capa externa antes de llenarse?
9. Nombrar tres polisacáridos compuestos de monómeros de glucosa. ¿En qué difieren estas macromoléculas entre sí?
10. Describir las propiedades de tres tipos diferentes de moléculas de lípidos. ¿Cuáles son sus respectivos papeles biológicos?
11. ¿Cuál es la principal propiedad que distingue a los diferentes aminoácidos entre sí? ¿Qué papel desempeñan estas diferencias en la estructura y función de las proteínas?
12. ¿Cuáles son las propiedades de la glicina, la prolina y la cisteína que distinguen a estos aminoácidos de todos los demás?
13. ¿Cuáles son las propiedades diferentes de una hélice α respecto de una lámina β ? ¿Cómo afecta cada una de estas estructuras secundarias a las propiedades de una proteína como α -queratina o seda?
14. Puesto que las proteínas actúan como mecanismos moleculares, explicar por qué los cambios de conformación son tan importantes en la función de las proteínas.
15. ¿Qué tipo de pruebas sugieren que las subunidades ribosómicas bacterianas son capaces de autoensamblado pero las subunidades eucariotas no lo son?

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. La anemia drepanocítica es resultado de la sustitución de una valina por un ácido glutámico. ¿Cuál sería el efecto esperado si la mutación fuera colocar una leucina en ese sitio? ¿Un ácido aspártico?
2. Elabore una lista con los siguientes compuestos respecto de la solubilidad esperada en agua: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, glucosa, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$.
3. ¿Cuántos isómeros estructurales se pueden formar a partir de una molécula con la fórmula C_5H_{12} ? ¿Con C_4H_8 ?
4. El gliceraldehído es la única aldótetrosa de tres carbonos y puede haber dos estereoisómeros. ¿Cuál es la estructura de la dihidroxiacetona, la única cetotriosa? ¿Cuántos estereoisómeros la forman?
5. Se conocen bacterias que cambian el tipo de ácidos grasos que producen conforme se modifica la temperatura de su ambiente externo. ¿Qué tipo de cambio se esperaría en los ácidos grasos cuando la temperatura desciende? ¿Por qué este cambio sería adaptativo?
6. ¿Cuál de los siguientes compuestos, si es el caso, consta de cadenas no ramificadas: polipéptidos, ácidos grasos, celulosa, glucógeno?
7. Identificar el carbono α en el esqueleto del polipéptido $-\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{C}-\text{C}-\text{NH}_2$.
8. ¿Cuál de las siguientes afirmaciones es cierta? Incrementando el pH de una solución: 1) se suprime la disociación de un ácido carboxílico; 2) aumenta la carga de un grupo amino; 3) aumenta la disociación de un ácido carboxílico; 4) se suprime la carga de un grupo amino.
9. ¿Cuál de los cuatro tipos de aminoácidos posee grupos R con el mayor potencial para formar enlaces de hidrógeno? ¿Cuál tiene el mayor potencial para formar enlaces iónicos? ¿Para formar interacciones hidrofóbicas?
10. Si las tres enzimas del complejo piruvato deshidrogenasa existieran como proteínas físicamente separadas en vez de complejo, ¿qué efecto tendría eso sobre la velocidad de las reacciones catalizadas por estas enzimas? ¿Por qué?

11. ¿Está usted de acuerdo en que la ribonucleasa ni la mioglobina tienen estructura cuaternaria? ¿Por qué sí o por qué no?
12. ¿Cuántos tripéptidos diferentes son posibles? ¿Cuántos carboxilos terminales están presentes en las cadenas de polipéptidos de una molécula de hemoglobina?
13. Usted aisló un pentapéptido compuesto de cuatro residuos de glicina y un residuo de lisina en el C terminal del péptido. Utilizando la información suministrada en el pie de la figura 2-27, si el pK del grupo R de lisina es 10 y el pK del grupo carboxilo terminal es 4, ¿cuál es la estructura del péptido a pH 7? ¿A pH 12?
14. ¿Por qué sería de esperar que la histidina con pK 6.5 participe en muchas reacciones enzimáticas?
15. ¿Sería de esperar que una solución salina muy concentrada fuera capaz de desnaturalizar ribonucleasa? En caso afirmativo, ¿por qué sí y en caso negativo por qué no?

BIBLIOGRAFIA

Química celular

- Atkins, P.W. 1987. *Molecules*. Scientific American Library.
- Baum, S.J. y Scaife, C.W. 1987. *Chemistry: A Life Science Approach*. 3a. edición, Macmillan.
- Felsenfeld, G. 1985. DNA. *Sci. Am.* 253:88-99 (oct.).
- Frieden, E. 1972. The chemical elements of life. *Sci. Am.* 227:52-64 (julio).
- Mohner, V.A. 1988. The challenge of acid rain. *Sci. Am.* 259:30-38 (agosto).
- Kemmer, F.N. 1979. *Water: The Universal Solvent*. 2a. edición, Nalco Chem.
- Pauling, L. 1960. *The Nature of the Chemical Bond*. 3a. edición, Cornell University Press.
- Gardner, R. 1982. *Water: The Life Sustaining Resource*. Julian Messner.
- Weinberg, R.A. y cols. 1985. The molecules of life. *Sci. Am.* 253:48-99 (oct.).

Bioquímica general

- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. y Cox, M.M. 1993. *Principles of Biochemistry*. 2a. edición, Worth Pub.
- Mathews, C.K. y van Holde, K.E. 1990. *Biochemistry*. Benjamin-Cummings.
- Rawn, J.D. 1989. *Biochemistry*. Neil Patterson Pub.
- Stryer, L. 1988. *Biochemistry*. 3a. edición, W.H. Freeman
- Voet, D. y Voet, J.G. 1995. *Biochemistry*. 2a. edición, John Wiley.

Radicales libres y enfermedad

- Allen, R.G. 1990. Role of free radicals in senescence. *Ann. Rev. Gerontol. Geriatrics* 10:198-213.
- Fridovich, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.* 64:97-112.
- Marx, J. 1993. Role of gene defect in hereditary ALS clarified. *Science* 261:986.
- Marx, J. 1994. Mouse model found for ALS. *Science* 264:1663-1664.
- Nowak, R. 1994. Beta-carotene: Helpful or harmful? *Science* 264:500-501.
- Meihorne, R.J. y Cole, G. 1985. The free radical theory of aging: A critical review. *Adv. Free Rad. Biol. & Med.* 1:165-223.

Aminoácidos y proteínas

- Branden, C. y Tooze, J. 1991. *Introduction to Protein Structure*, Garland.
- Creighton, T.E. 1993. *Proteins*, 2a. edición, W.H. Freeman.

- Davies, J.S., ed. 1985. *Amino Acids and Peptides*. Chapman & Hall.
- Dickerson, R.E. y Geis, I. 1969. *The Structure and Action of Proteins*. Benjamin-Cummings.
- Doolittle, R.F. y Bork, P. 1993. Evolutionarily mobile modules in proteins. *Sci. Am.* 269:50-56 (oct.).
- Karplus, M. y McCammon, 1986. The dynamics of proteins. *Sci. Am.* 254:42-51 (abril).
- Kendrew, J.C. 1963. Myoglobin and the structure of proteins. *Science* 139:1259-1266.
- Meister, A. 1965. *Biochemistry of the Amino Acids*. 2a. edición, vol. 1, Academic Press.
- Orengo, C.A., Jones, D.T. y Thornton, J.T. 1994. Protein superfamilies and domain superfolds. *Nature* 372:631-634.
- Perutz, M. 1992. *Protein Structure: New Approaches to Disease and Therapy*. W.H. Freeman.
- Perutz, M.F. 1964. The hemoglobin molecule. *Sci. Am.* 211:64-76 (nov.).
- Sanger, F. 1988. Sequences, sequences, sequences. *Ann. Rev. Biochem.* 57:1-28.
- Schulz, G.E. y Schirmer, R.H. 1990. *Principles of Protein Structure*, 2a. edición, Springer-Verlag.
- Plegamiento de proteínas y autoensamblado**
- Agard, D.A. 1993. To fold or not to fold. *Science* 260:1903-1904.
- Anfinsen, C.B. 1972. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* 181:223-230.
- Caspar, D.L.D. y Namba, K. 1990. Switching in the self-assembly of tobacco mosaic virus. *Adv. Biophysics* 26:157-185.
- Craig, E.A., Weissman, J.S. y Horwich, A.L. 1994. Heat shock proteins and molecular chaperones. *Cell* 78:365-372 (Meeting review).
- Englander, S.W. 1993. In pursuit of protein folding. *Science* 262:848-849.
- Hartl, F.U., Hlodan, R. y Langer, T. 1994. Molecular chaperones in protein folding: The art of avoiding sticky situations. *Trends in Biochem. Sci.* 19:20-24.
- Hartl, F.U. 1994. Secrets of a double-doughnut. *Nature* 371:557-558.
- Hendricks, J.P. y Hartl, F.U. 1993. Molecular chaperone functions of heat shock proteins. *Annual Review of Biochemistry* 62:349-384.
- Nomura, M. 1987. The role of RNA and protein in ribosome function: A review of early reconstitution studies and prospects for future studies. *Cold. Spring Harbor Symp.* 52:653-663.

Energía, enzimas y metabolismo

3-1 Energía

3-2 Enzimas

La perspectiva humana: El creciente problema de la resistencia a los antibióticos

3-3 Metabolismo

La vía experimental: Determinación del mecanismo de acción de la lisozima

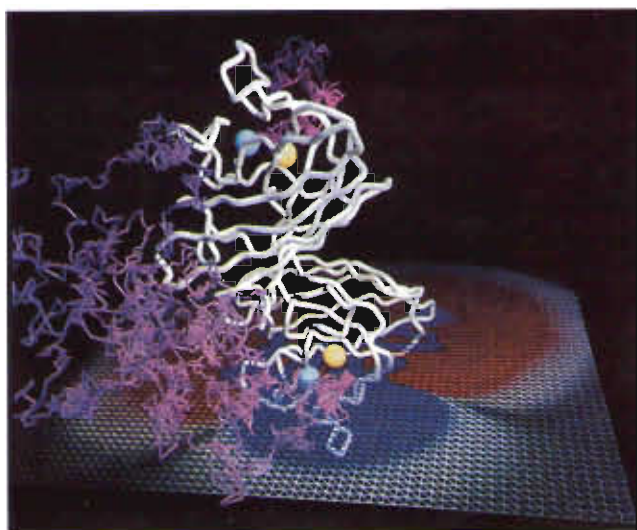


FIGURA 3-A. Modelo generado por computadora de una versión modificada genéticamente de la enzima superóxido dismutasa. La enzima se muestra en verde, los iones metálicos (cobre y zinc) del sitio activo se muestran como esferas, la vía de llegada del sustrato (un radical superóxido) se muestra en púrpura y el potencial electrostático que rodea al sitio activo se representa mediante una rejilla. (Cortesía de Elizabeth Getzoff, J. Tamer y M. Pique, del Scripps Research Institute.)

La relación entre estructura y función es evidente en todos los niveles de organización biológica, desde el molecular hasta el orgánico. En el capítulo precedente vimos que las proteínas tienen una estructura tridimensional intrincada que depende de los fragmentos particulares de la molécula presentes precisamente en el sitio correcto. En este capítulo consideraremos con más detalle un amplio grupo de proteínas, las enzimas, y veremos cómo su compleja arquitectura les confiere la capacidad de acelerar ampliamente la velocidad de las reacciones biológicas. Para comprender de qué manera las enzimas pueden lograr esto es necesario considerar el flujo de energía que ocurre durante una reacción química, lo que conduce al tema de la termodinámica. Una breve revisión de los principios de la termodinámica nos ayudará a explicar muchos de los procesos celulares que analizaremos en éste y los siguientes capítulos, incluyendo el movimiento de iones a través de las membranas, la formación de ATP y la síntesis de macromoléculas. Como veremos, el análisis termodinámico de un sistema particular puede revelar si los acontecimientos pueden ocurrir o no de manera espontánea, y en caso contrario suministra una medida de la energía que la célula debe gastar para que tenga lugar el proceso. En la última sección de este capítulo veremos cómo se vinculan las reacciones individuales para formar vías metabólicas y cómo se puede controlar el flujo de energía y de materia prima a través de ciertas vías.

3-1 Energía

Una célula viva hierve en actividad. Las macromoléculas de todos los tipos son ensambladas a partir de materias primas, se producen y excretan productos de desperdicio, fluyen instrucciones genéticas desde el núcleo hacia el cito-

plasma, las vesículas se mueven desde el complejo Golgi hacia la membrana plasmática, los iones son bombeados a través de las membranas celulares, y así sucesivamente. Para mantener este elevado nivel de actividad, la célula necesita energía. Por último, la energía empleada como combustible para la vida se deriva de la energía luminosa atrapada por las células vegetales y convertida en compuestos orgánicos ricos en energía. La mayor parte de los organismos obtiene su energía alimentándose de plantas o de organismos que se alimentan de plantas.

Energía se define como la capacidad para hacer trabajo, o sea, capacidad para cambiar o mover alguna cosa. La energía existe en dos estados alternativos: potencial y cinética. La roca sostenida sobre el borde de un risco posee **energía potencial** debido a que tiene la posibilidad de efectuar trabajo. Este potencial se debe a que se encuentra dentro de un campo de fuerzas, en este caso el campo gravitacional. Si se empuja la roca más allá de la orilla entonces la fuerza puede actuar y hacerla caer. Durante la caída, la roca tiene **energía cinética** y puede efectuar trabajo, por ejemplo, levantando otro objeto, como se muestra en la figura 3-1. De manera similar, una célula nerviosa en reposo tiene energía potencial cuando mantiene una elevada concentración de iones sodio en el lado externo de su membrana plasmática y una baja concentración de estos mismos iones en su lado interno. Igual que el flujo de agua a través de una presa, al abrirse conductos específicos en la membrana plasmática los iones sodio fluyen a través de la membrana hacia el interior de la célula. El movimiento de iones sodio en dirección al interior de la célula es una forma de energía cinética que se puede emplear para realizar trabajo, como ocurre cuando un impulso nervioso viaja a lo largo de la membrana de una célula nerviosa.

En los dos casos descritos (la roca que cae y el movimiento de los iones sodio en dirección al interior de la célula), como siempre que se mide la energía durante el trabajo,

CUADRO 3-1. Factores de potencia y capacidad en las mediciones de energía

Tipo de energía	Factor de potencia	Factor de capacidad
<i>Mecánica</i>		
Caída de una roca	Altura	Masa
Compresión	Presión	Volumen
Estiramiento	Tensión	Longitud
<i>Eléctrica</i>		
Movimiento de iones	Potencial eléctrico (voltaje)	Carga
<i>Osmótica</i>		
Movimiento de agua hacia el interior de una célula	Concentración de solutos	Masa
<i>Energía no disponible para efectuar trabajo</i>	Temperatura	Entropía

se deben considerar dos factores: un factor de potencia y un factor de capacidad (cuadro 3-1). El factor de potencia es proporcional a la intensidad del campo de fuerzas, en tanto que el factor de capacidad suministra cierta medida de la "magnitud" de la materia considerada. En el caso de la roca que cae, el factor de potencia es la distancia que recorre y el factor de capacidad es la masa de la roca. Para el movimiento de iones cargados, el factor de potencia es el voltaje y el factor de capacidad es la carga de las partículas. El trabajo, o energía liberada durante estos acontecimientos, es un múltiplo de estos dos factores; conforme un factor crece, también se incrementa la cantidad de energía.



La roca posee energía potencial

Al caer, la roca tiene energía cinética

La roca ha realizado trabajo

FIGURA 3-1. Realización de trabajo. En esta caprichosa composición fotográfica, la roca suspendida en lo alto de la muralla tiene energía potencial. La energía disponible para efectuar trabajo es proporcional a la masa de la roca y a la distancia que puede caer. Una vez que abandona el borde de la muralla, la roca posee energía cinética que se puede emplear para efectuar trabajo, en este caso elevando al pez.

Leyes de la termodinámica y concepto de entropía

Termodinámica es el estudio de los cambios energéticos que acompañan a los acontecimientos del universo. En las siguientes páginas centraremos nuestra atención en un conjunto de conceptos que nos permitirán predecir la dirección que seguirán los hechos y si un acontecimiento requiere o no del ingreso de energía para que ocurra. Sin embargo, los principios de la termodinámica no ayudan a determinar con qué rapidez ocurrirá un proceso específico ni el mecanismo que la célula emplea para llevarlo a cabo.

Primera ley de la termodinámica

La primera ley de la termodinámica se refiere a la conservación de la energía. Afirma que la energía no se puede crear ni destruir. Sin embargo, se puede convertir (**transformar**) de una forma a otra. La energía eléctrica se convierte en energía mecánica cuando la aplicamos a un reloj, y la energía química se convierte en energía térmica cuando sirve como combustible y se quema en un calentador de petróleo. Las células son capaces de transformar energía. La energía química presente en polisacáridos y grasas almacenados se emplea sobre todo para efectuar reacciones químicas que requieren energía, pero también se convierte en energía mecánica cuando los organelos se desplazan de un lugar a otro dentro de la célula; a energía química cuando se libera calor durante la contracción muscular, o a energía eléctrica cuando fluyen iones a través de una membrana. La transformación más importante de energía en el mundo biológico es la conversión de energía solar en energía química: el proceso de la **fotosíntesis**, que suministra el combustible que de manera directa o indirecta constituye la fuerza motriz para casi todas las formas de vida.¹ Algunos animales, incluyendo luciérnagas y peces luminosos, pueden convertir una parte de su energía química otra vez en luz. Sin embargo, cualquiera que sea el proceso de transformación, la cantidad de energía total permanece constante en el universo.

A fines del siglo XIX, la primera ley de la termodinámica se extendió a los organismos vivos a través de experimentos en los cuales se mantenía a sujetos en un ambiente controlado y se llevaba el registro del consumo de energía. Se observó que la energía consumida por estos individuos en forma de nutrientes se equilibraba por la energía liberada en forma de productos de desperdicio y calor.

Para analizar las transformaciones de energía que afectan a la materia es necesario dividir el universo en dos partes: el *sistema* bajo estudio y el resto del universo, al cual nos referiremos como el *entorno*. Un sistema se puede definir de varias maneras. Puede ser cierto espacio en el universo o cierta cantidad de materia. Por ejemplo, el sistema puede ser una célula viva. En la mayor parte de los siste-

mas termodinámicos es necesario estipular que no intercambia *materia* con su entorno; es un *sistema cerrado*. Por lo contrario, el sistema puede intercambiar *energía* con su entorno.

Los cambios de energía de un sistema que ocurren durante un acontecimiento se manifiestan de dos maneras: como cambio en el contenido de calor del sistema y en la ejecución de trabajo. Aunque el sistema puede ganar o perder energía, la primera ley de la termodinámica indica que la pérdida o ganancia debe ser equilibrada por una pérdida o ganancia correspondiente en el entorno, de modo que la cantidad total de energía en el universo permanezca constante. La energía del sistema se llama *energía interna* (E), y el cambio de la energía interna durante una transformación es ΔE . Una manera de describir la primera ley de la termodinámica es que $\Delta E = Q - W$, donde Q es la energía calorífica y W es la energía de trabajo. Si durante el acontecimiento se absorbe calor del entorno al interior del sistema, entonces Q es positiva; si se pierde calor hacia el entorno, Q es negativa. Si el sistema efectúa trabajo sobre el entorno (incrementando en volumen y comprimiendo el entorno), entonces W es positiva; cuando se efectúa trabajo sobre el sistema, W es negativa.

La ecuación precedente indica que la cantidad de trabajo realizado y de calor intercambiado pueden variar durante una transformación particular (como la caída de la roca de la figura 3-1), pero la *diferencia* entre estas dos cantidades cuantificables no varía. En el caso de la roca que cae, el cambio de esa cantidad de masa a través de una altura determinada da como resultado un cambio específico de la energía interna del sistema; por ejemplo, no hace diferencia lo que ocurra a la roca durante el trayecto. Las diferencias de energía son independientes de la vía que sigue el sistema conforme pasa desde el estado de energía inicial hasta el estado de energía final (p. ej., desde el borde del risco hasta abajo). Lo mismo es cierto para las transformaciones biológicas de la energía, como ocurre, por ejemplo, cuando se convierte glucosa a CO_2 y H_2O . La misma cantidad de energía se libera cuando se quema la glucosa en una llama como cuando se oxida paso a paso dentro de una célula. Esto es conveniente para los bioquímicos, ya que la energía liberada durante la descomposición de la glucosa se determina con mayor facilidad quemándola en una cámara de laboratorio (*calorímetro*) que midiéndola dentro de la célula.

Según el proceso, la energía interna del sistema al final puede ser mayor, igual o menor que al principio, dependiendo de su relación con el entorno (fig. 3-2). En otras palabras, ΔE puede ser positiva, cero o negativa. Consideremos que el sistema sea el contenido de un vaso de reacción (no diferente a una célula viva). Mientras no haya cambios de presión o de volumen del contenido, el sistema no efectúa trabajo sobre su entorno, y viceversa. En este caso, $\Delta E = \Delta Q$, y la energía al final de la transformación será mayor que al principio si se absorbió calor (ganancia) y menor si se liberó calor (pérdida). En condiciones de volumen y presión constantes, las reacciones que pierden calor se denominan *exotérmicas* y las que ganan calor son *endotérmicas*. Hay muchas reacciones de ambos tipos. Puesto que ΔE para un proceso particular puede ser positiva o negati-

¹ Las únicas comunidades de organismos independientes de la fotosíntesis residen en los respiraderos de las fuentes termales en el fondo del océano y dependen de la energía obtenida por quimiosíntesis bacteriana.

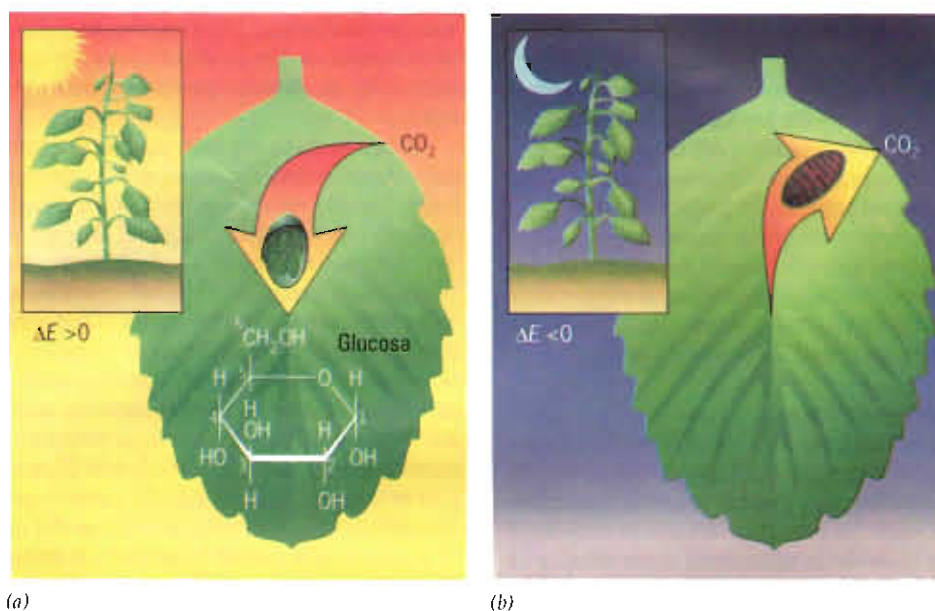


FIGURA 3-2. Cambio en la energía interna del sistema. En este ejemplo, el sistema se define como la hoja particular de una planta. *a)* En el día, pigmentos fotosintéticos de los cloroplastos de la hoja absorben la luz del sol y la emplean para convertir CO_2 en carbohidratos, como la molécula de glucosa que se muestra en el dibujo (la cual después se incorpora a sucrosa y almidón). Conforme la célula absorbe la luz, su energía interna aumenta; la energía presente en el resto del universo tiene que disminuir. *b)* En la noche se invierte la relación energética entre la célula y su entorno a medida que los carbohidratos producidos durante el día se oxidan para formar CO_2 en las mitocondrias y la energía se emplea para poner en marcha las actividades nocturnas de la célula.

va, nos suministra información en cuanto a la probabilidad de que ocurra cierto acontecimiento. Para determinar la probabilidad de una transformación particular necesitamos considerar algunos conceptos adicionales.

Segunda ley de la termodinámica

La **segunda ley de la termodinámica** expresa el concepto de que los acontecimientos en el universo tienen una dirección; siempre proceden "cuesta abajo" desde un estado de energía más alta a un estado de energía más baja. Así, en una transformación energética cada vez hay menor energía disponible para efectuar trabajo adicional. Las rocas que caen desde el risco hasta el piso, una vez en el piso se reduce su capacidad para efectuar más trabajo; es muy poco probable que puedan elevarse otra vez por sí mismas hasta la cumbre del risco. De manera similar, las cargas opuestas normalmente se mueven para unirse, no para separarse, y el calor fluye desde los puntos más calientes a los cuerpos más fríos, no a la inversa. Se dice que estos acontecimientos son **espontáneos**, término que indica que la termodinámica los favorece y pueden ocurrir *sin el aporte de energía externa*.

El concepto de la segunda ley de la termodinámica originalmente se formuló para máquinas operadas con calor y lleva implícita la idea de que es termodinámicamente imposible construir una máquina de movimiento perpetuo. En otras palabras, es imposible que una máquina rinda 100% de eficacia, condición requerida si la máquina continúa funcionando sin ingreso de energía externa. Inevitablemente se pierde algo de energía conforme la máquina efectúa su ac-

tividad. Una relación similar también es cierta para los organismos vivos. Por ejemplo, cuando una jirafa ramonea las hojas de un árbol o un león atrapa a la jirafa, la mayor parte de la energía química contenida en el alimento nunca estará disponible para el animal que lo comió. La energía no disponible para efectuar trabajo adicional luego de un acontecimiento tiene un factor de intensidad y un factor de capacidad, igual que los otros términos energéticos (véase cuadro 3-1). El factor de intensidad es la temperatura (en grados) y el factor de capacidad es la **entropía (S)**, que tiene las dimensiones de energía por grado (o sea, calorías por grado). El término para energía no disponible es $T\Delta S$, donde ΔS es el cambio de entropía entre los estados inicial y final.

La pérdida de energía disponible durante un proceso es resultado de la tendencia del universo a incrementar el azar o el desorden cada vez que se transfiere energía. La entropía suministra una medida del desorden; se relaciona con los movimientos *al azar* de las partículas de la materia, los cuales, debido a que son al azar, no se pueden aprovechar para ejecutar un proceso *dirigido* de trabajo. Según la segunda ley de la termodinámica, cada acontecimiento se acompaña de un incremento en la entropía del universo. Por ejemplo, cuando se deja caer un cubito de azúcar en una taza de agua caliente hay un cambio espontáneo de las moléculas, desde un estado ordenado en el cristal a una condición de mucho mayor desorden cuando las moléculas de azúcar se dispersan por toda la solución (fig. 3-3, *a*). A medida que las moléculas del cubo de azúcar se disuelven

en la solución, su libertad de movimiento se incrementa igual que la entropía del sistema. El cambio desde el estado concentrado hasta el disperso es resultado de los movimientos al azar de las moléculas. Finalmente, la dispersión de las moléculas de azúcar es igual en todo el volumen disponible porque el estado de distribución uniforme es el estado más probable.

La liberación de calor, como ocurre, por ejemplo, en la oxidación de la glucosa dentro de una célula o por la fricción generada conforme la sangre fluye a través de un vaso, es otro ejemplo de incremento de la entropía. La liberación de energía térmica por organismos vivos sólo sirve para incrementar la velocidad de los movimientos al azar de los átomos y las moléculas; no se puede reorientar para efectuar trabajo adicional. La energía de los movimientos molecular y atómico aumenta con la temperatura y así también se incrementa la entropía. Sólo en el cero absoluto (0°K), cuando todo movimiento cesa, la entropía es igual a cero.

Igual que con otros acontecimientos espontáneos, se debe distinguir entre el sistema y su entorno. La segunda ley de la termodinámica sólo indica que la entropía total del universo debe incrementarse; el desorden dentro de una parte del universo (sistema) puede disminuir a expensas de su entorno. La entropía del azúcar disuelta puede disminuir; se puede recrystalizar evaporando el agua (fig. 3-3, b). Sin embargo, la consecuencia de este proceso es un incremento en la entropía del entorno. El incremento de la libertad de movimiento de las moléculas de agua en fase gaseosa compensa con mucho la disminución de la libertad de las moléculas en los cristales de azúcar.

La vida opera sobre un principio similar. Los organismos vivos tienen capacidad para disminuir su propia entropía incrementando la entropía de su ambiente. La entropía disminuye en un organismo cuando moléculas relativamente simples, como los aminoácidos, se ordenan en moléculas más complejas, como la proteína mioglobina de una célula muscular. Sin embargo, al mismo tiempo, la entropía del ambiente aumenta cuando moléculas complejas ordenadas como el glucógeno almacenado en el hígado o en el tejido muscular se convierten en calor y en compuestos más pequeños menos ordenados (como CO_2 y H_2O) que se liberan al ambiente. Esta característica del metabolismo es lo que permite a los organismos vivos mantener un estado altamente ordenado e improbable.

Otra medida del estado energético de un organismo vivo es la información contenida en sus macromoléculas. La información es algo difícil de definir, pero fácil de reconocer. La información se puede medir en términos de la disposición ordenada de las subunidades de una estructura. Por ejemplo, proteínas y ácidos nucleicos, en los cuales la disposición lineal específica de las subunidades es muy ordenada, es baja en entropía y alta en contenido de información. Conservar un estado con alto contenido de información (baja entropía) requiere el ingreso de energía. Consideremos una sola molécula de DNA localizada en una célula hepática. Esta célula tiene docenas de diferentes enzimas cuya única función es determinar la aparición de daños en el DNA y repararlos (sección 13-2). El daño a un nucleótido de una célula activa puede ser tan nocivo que sin este

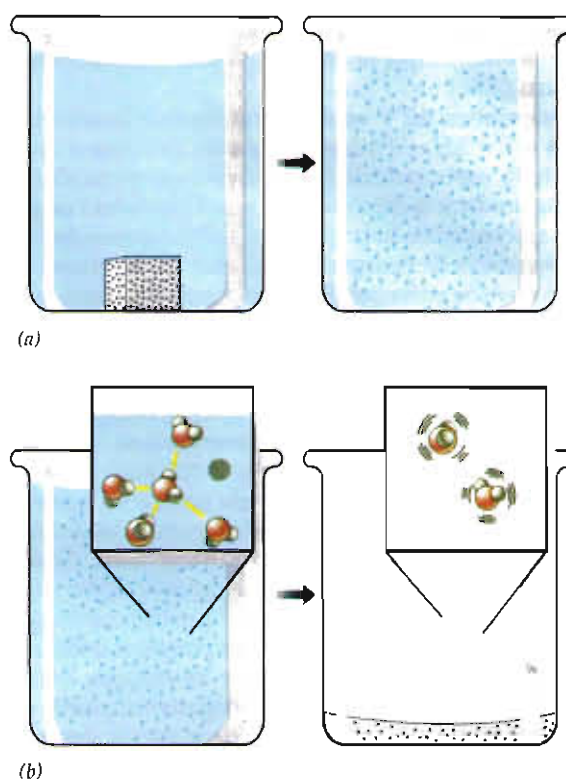


FIGURA 3-3. Los acontecimientos se acompañan de un incremento en la entropía del universo. a) Un cubo de azúcar contiene moléculas de sucrosa en disposición altamente ordenada, en la cual la libertad de movimiento de las moléculas individuales está bastante restringida. Conforme el cubo se disuelve, la libertad de movimiento de las moléculas de sucrosa aumenta mucho y sus movimientos al azar causan que al final sus moléculas se distribuyan uniformemente en todo el espacio disponible. Una vez que esto ocurre, no hay tendencia adicional a la redistribución y la entropía del sistema está en un máximo. b) Las moléculas de azúcar distribuidas al azar en toda la solución pueden retornar a un estado de orden, pero sólo si la entropía del entorno aumenta, como ocurre cuando las moléculas de agua ordenadas de la fase líquida se desordenan mediante evaporación.

gasto de energía el contenido de información del DNA rápidamente se deteriora.

Energía libre

En conjunto, las dos leyes de la termodinámica, primera y segunda, indican que la energía del universo es constante pero la entropía continúa aumentando hasta un máximo. Los conceptos inherentes en las primeras dos leyes fueron reunidos por el químico estadounidense J. Willard Gibbs, en 1878, en la expresión $\Delta H = \Delta G + T\Delta S$, donde ΔG es el cambio en **energía libre**, o sea, el cambio de energía disponible durante un proceso para efectuar trabajo; ΔH es el cambio en *entalpía* o contenido total de energía del sistema (para nuestros propósitos equivalente a ΔE); T es la temperatura absoluta ($^{\circ}\text{K} = ^{\circ}\text{C} + 273$); y ΔS es el cambio de entropía del sistema. La ecuación afirma que el cambio total

de energía es igual a la suma de los cambios en energía útil (ΔG) y la energía que no está disponible para hacer trabajo adicional ($T\Delta S$).

Despejando ΔT y volviendo a plantear la ecuación tenemos $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$; esta ecuación suministra una medida de la espontaneidad de un proceso particular. Nos permite predecir la dirección en la cual procederá un proceso y la extensión de dicho proceso. Todas las transformaciones espontáneas de energía deben tener ΔG negativa; o sea, el proceso debe proceder desde un estado de mayor energía libre a un estado de menor energía libre. La magnitud de ΔG indica la máxima cantidad de energía que se puede liberar para emplear en otro proceso. Los procesos que pueden ocurrir espontáneamente, p. ej., los favorecidos termodinámicamente, se describen como **exergónicos**. Estos procesos tienen $-\Delta G$. Por lo contrario, si ΔG para un proceso dado es positiva, entonces no puede ocurrir de manera espontánea. Estos procesos son desfavorecidos en forma termodinámica y se describen como **endergónicos**. Como veremos, las reacciones normalmente endergónicas pueden producirse acoplándolas a procesos que liberan energía.

Los signos ΔH y ΔS pueden ser positivos o negativos, según la relación entre el sistema y su entorno. (ΔH será positivo si el sistema gana calor y negativo si pierde calor; ΔS será positivo si el sistema tiende a mayor desorden y negativo cuando suele ser menos desordenado.) La interrelación entre ΔH y ΔS se ilustra en la transformación del agua en hielo. La conversión del agua del estado líquido al estado sólido se acompaña de disminución de la entropía (ΔS es negativa, según se ilustra en la figura 3-4) y disminución en la entalpía (ΔH es negativa). Para que esta transformación ocurra (o sea para que ΔG sea negativa), ΔH debe ser más negativa que $T\Delta S$, condición que sólo ocurre bajo 0°C . Esta relación se puede observar en el cuadro 3-2, que indica los valores para los diferentes términos si un mol de

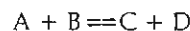


FIGURA 3-4. Cuando el agua se congela su entropía disminuye debido a que las moléculas de agua del hielo existen en estado más ordenado, con menos libertad de movimiento que en el estado líquido. La disminución de entropía es particularmente notable en la formación de un cristal de nieve. (© Nuridsany and Perennou/Photo Researches.)

agua se convierte en hielo a 10°C , 0°C o -10°C . En todos los casos, cualquiera que sea la temperatura, el nivel energético del hielo es menor que el del agua líquida (ΔH es negativa). Sin embargo, a temperaturas más elevadas, el término de la ecuación correspondiente a la entropía ($T\Delta S$) es más negativo que el término de la entalpía, y por lo tanto el cambio de energía libre es positivo y el proceso no puede ocurrir espontáneamente. A 0°C , el sistema se encuentra en equilibrio, en tanto que a -10°C el proceso de solidificación es muy favorecido; o sea, ΔG es negativa.

Cambios de energía libre en las reacciones químicas

Una vez analizado el concepto de energía libre en términos generales, podemos aplicar la información a las reacciones químicas que ocurren dentro de la célula. Todas las reacciones químicas dentro de la célula son reversibles y por lo tanto consideraremos dos reacciones que ocurren en forma simultánea, una hacia adelante y la otra en sentido inverso. Según la ley de acción de las masas, la velocidad de una reacción es proporcional a la concentración de los reactantes. Por ejemplo, consideremos esta reacción hipotética:



La velocidad de la reacción hacia adelante es directamente proporcional al producto de las concentraciones molares de A y B. Esto puede expresarse como velocidad de la reacción hacia adelante igual a $k_1[A][B]$, donde k_1 es una velocidad constante para la reacción hacia adelante. La velocidad de la reacción inversa es igual a $k_2[C][D]$. Sin embargo, todas las reacciones proceden lentamente hacia un estado de equilibrio; o sea, un punto en el cual las velocidades de reacción en uno y otro sentido son iguales. En el equilibrio, igual número de moléculas A y B serán convertidas en moléculas C y D por unidad de tiempo. Por lo tanto, en el equilibrio

$$k_1[A][B] = k_2[C][D]$$

ecuación que se puede replantear de la siguiente manera

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

En otras palabras, en el equilibrio hay una proporción predecible entre concentración de productos y concentración de reactantes. Esta proporción, igual a k_1/k_2 , se denomina **constante de equilibrio, K_{eq}** .

La constante de equilibrio permite predecir la dirección favorecida (hacia adelante o inversa) de la reacción en un conjunto de condiciones determinadas. Supongamos, por ejemplo, que estudiamos la reacción de arriba y acabamos de mezclar los cuatro componentes (A, B, C, D) de modo que cada uno esté presente en concentración 0.5 M.

$$\frac{[C][D]}{[A][B]} = \frac{[0.5][0.5]}{[0.5][0.5]} = 1$$

La dirección de esta reacción depende de la constante de equilibrio. Si la K_{eq} es mayor que uno, la reacción procederá a mayor velocidad en la dirección de formar los productos C y D que en la dirección inversa. Por ejemplo, si K_{eq} es 9.0, entonces en el equilibrio la concentración de reactantes y

CUADRO 3-2. Termodinámica de la transformación hielo-agua

Temperatura (°C)	ΔE (cal/mol)	ΔH (cal/mol)	ΔS (cal/mol·°C)	$T\Delta S$ (cal/mol)	ΔG (cal/mol)
-10	-1 343	-1 343	-4.9	-1 292	-51
0	-1 436	-1 436	-5.2	-1 436	0
+10	-1 529	-1 529	-5.6	-1 583	+5.4

FUENTE: I. M. Klotz, "Energy in Biochemical Reactions". Academic Press, 1967.

productos en esta mezcla particular de reacción será de 0.25 M y 0.75 M, respectivamente.

$$\frac{[C][D]}{[A][B]} = \frac{[0.75][0.75]}{[0.25][0.25]} = 9$$

Por otro lado, si K_{eq} es menor que uno, la reacción inversa procederá a mayor velocidad que la reacción hacia adelante, de modo que la concentración de A y B se elevará a expensas de C y D. De esto se deduce que la dirección de una reacción en cualquier momento depende de la concentración relativa de todas las moléculas en ese momento y que puede predecirse por la K_{eq} .

Retornemos al asunto de la energética. La proporción entre reactantes y productos presentes en el equilibrio es determinada por los niveles relativos de energía libre de las sustancias en cada miembro de la ecuación. En tanto la energía libre total de los reactantes sea mayor que la energía libre total de los productos, ΔG tendrá valor negativo y la reacción procederá en la dirección de formar productos. Cuanto mayor sea la ΔG , más alejada estará la reacción del equilibrio. Conforme la reacción procede, la diferencia del contenido de energía libre entre reactantes y productos disminuye (ΔG se hace menos negativa), hasta que en el equilibrio la diferencia es cero ($\Delta G = 0$).

Puesto que ΔG para una reacción dada depende de la mezcla de reacción presente en todo momento, no es un término útil para comparar la energía de diferentes reacciones. Para obtener reacciones sobre bases comparables y efectuar varios tipos de cálculos, se adoptó una convención considerando la diferencia de energía libre entre reactantes y productos en un conjunto determinado de **condiciones estándar**. Para reacciones bioquímicas, las condiciones se establecen arbitrariamente usando una mezcla de reacción a 25°C (298°K) y una atmósfera de presión con todos los reactantes y productos a concentración 1.0 M, excepto el agua, presente a 55.6 M y H^+ a 10^{-7} M (pH 7.0).² La diferencia de energía libre estándar (ΔG°) describe la diferencia de energía libre cuando un mol de cada reactante se convierte en un mol de producto en esas condiciones. Recordemos que en una célula no prevalecen condiciones estándar, y por lo tanto hay que ser cauteloso al emplear valores para diferencias de energía libre estándar en cálculos de energética celular.

² ΔG° indica condiciones estándar que incluyen pH 7, en tanto que ΔG° indica condiciones estándar a 1 M H^+ (pH 0.0). La designación K'_{eq} también indica una mezcla de reacción a pH 7.

La relación entre constante de equilibrio y diferencia de energía libre estándar está dada por la ecuación

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K'_{eq}$$

Si el logaritmo natural (ln) se convierte a $\log_{10}$, la ecuación se convierte en

$$\Delta G^\circ = -2.303 RT \log K'_{eq}$$

donde R es la constante de los gases (1.987 cal/mol·°K) y T es la temperatura absoluta (298°K).³ Recordemos que el log de 1.0 es cero. Por consiguiente, de la ecuación de arriba se deduce que las reacciones cuya constante de equilibrio es mayor que uno tendrán valores ΔG° negativos, lo que indica que pueden ocurrir espontáneamente en *condiciones estándar*. Las reacciones cuya constante de equilibrio es menor que uno tendrán valores ΔG° positivos y no pueden ocurrir espontáneamente en condiciones estándar. En otras palabras, en una reacción que se puede escribir: $A + B \rightleftharpoons C + D$, si ΔG° es negativo, la reacción ocurrirá hacia la derecha cuando reactantes y productos estén presentes en concentración 1.0 M a pH 7. Cuanto más negativo sea el valor, la reacción ocurrirá en mayor extensión hacia la derecha antes de alcanzar el equilibrio. En las mismas condiciones, si ΔG° es positiva, la reacción procederá a la izquierda; o sea, se favorece la reacción inversa. La relación entre ΔG° y K'_{eq} se muestra en el cuadro 3-3.

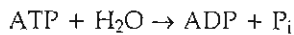
³ El término a la derecha de esta ecuación equivale a la cantidad de energía libre perdida conforme la reacción procede desde condiciones estándar hasta el equilibrio.

CUADRO 3-3. Relación entre ΔG° y K'_{eq} a 25°C

K'_{eq}	ΔG° (kcal/mol)
10^6	-8.2
10^4	-5.5
10^2	-2.7
10^1	-1.4
10^0	0.0
10^{-1}	1.4
10^{-2}	2.7
10^{-4}	5.5
10^{-6}	8.2

Cambios de energía libre en las reacciones metabólicas

Una de las reacciones químicas más importantes en la célula es la hidrólisis del ATP (fig. 3-5). En la reacción



la diferencia de energía libre estándar entre productos y reactantes es -7.3 kcal/mol. Con base en esta información, es evidente que en condiciones estándar la hidrólisis de ATP es una reacción muy favorecida (exergónica), o sea, tiende a una proporción $[\text{ADP}]/[\text{ATP}]$ mayor en el equilibrio. Hay varias razones por las cuales esta reacción es tan favorecida; una es evidente en la figura 3-5. La repulsión electrostática creada por las cuatro cargas negativas muy próximas en el espacio situadas sobre ATP^{4-} se liberan parcialmente por la formación de ADP^{3-} .

Es importante tener muy clara la diferencia entre ΔG y ΔG° . ΔG° es un valor fijo que describe la dirección en la cual procede una reacción cuando la mezcla reaccionante se encuentra en condiciones estándar. Puesto que en la célula no prevalecen condiciones estándar, los valores ΔG° no pueden emplearse para predecir la dirección de una reacción particular en un momento dado dentro de un compartimiento celular particular. Para esto, es necesario conocer ΔG , determinada por la concentración de reactantes y productos para la reacción presente en ese momento.

$$\Delta G = \Delta G^\circ + 2.303RT \log \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

$$\Delta G = \Delta G^\circ + 2.303 (1.987 \text{ cal/mol} \cdot ^\circ\text{K}) (298^\circ\text{K}) \log \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

$$\Delta G = \Delta G^\circ + (1.4 \text{ kcal/mol}) \log \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

donde $[A]$, $[B]$, $[C]$ y $[D]$ son las verdaderas concentraciones en el momento dado. Los valores ΔG revelan la dirección de

la reacción dentro de la célula y qué tan cerca se encuentra del equilibrio la reacción particular. Por ejemplo, la concentración celular típica de reactantes y productos en la hidrólisis de ATP puede ser $[\text{ATP}] = 10 \text{ mM}$; $[\text{ADP}] = 1 \text{ mM}$; $[\text{P}_i] = 10 \text{ mM}$. Sustituyendo estos valores en la ecuación,

$$\Delta G = \Delta G^\circ + 2.303RT \log \frac{[\text{ADP}][\text{P}_i]}{[\text{ATP}]}$$

$$\Delta G = -7.3 \text{ kcal/mol} + (1.4 \text{ kcal/mol}) \log \frac{[10^{-3}][10^{-2}]}{[10^{-2}]}$$

$$\Delta G = -7.3 \text{ kcal/mol} + (1.4 \text{ kcal/mol}) (-3)$$

$$\Delta G = -11.5 \text{ kcal/mol}$$

Por lo tanto, aunque ΔG° para la hidrólisis de ATP es -7.3 kcal/mol, en la célula la ΔG típica para esta reacción es de casi -12 kcal/mol debido a que la célula mantiene una elevada proporción $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$.

Las células efectúan muchas reacciones con valores ΔG° positivos porque son capaces de mantener condiciones que favorecen el avance de las reacciones. Esto puede ocurrir de dos maneras. La primera ilustra la importante diferencia entre ΔG y ΔG° , y la segunda revela cómo pueden sustituirse reacciones con valor ΔG° positivo por diferentes reacciones con valor ΔG° negativo empleando la energía química almacenada en la célula.

Consideremos la reacción de la glucólisis (véase figura 3-23) en la cual el fosfato de dihidroxiacetona se convierte en gliceraldehído 3-fosfato. ΔG° para esta reacción es $+1.8$ kcal/mol, aunque la formación del producto esta reacción ocurre en la célula. La reacción procede debido a que otras reacciones celulares mantienen la relación entre reactante y producto por arriba de la relación definida por la constante de equilibrio. En tanto esta condición se mantiene, la ΔG° será negativa y la reacción continuará espontáneamente en la dirección de formar gliceraldehído 3-fosfato. Esto revela

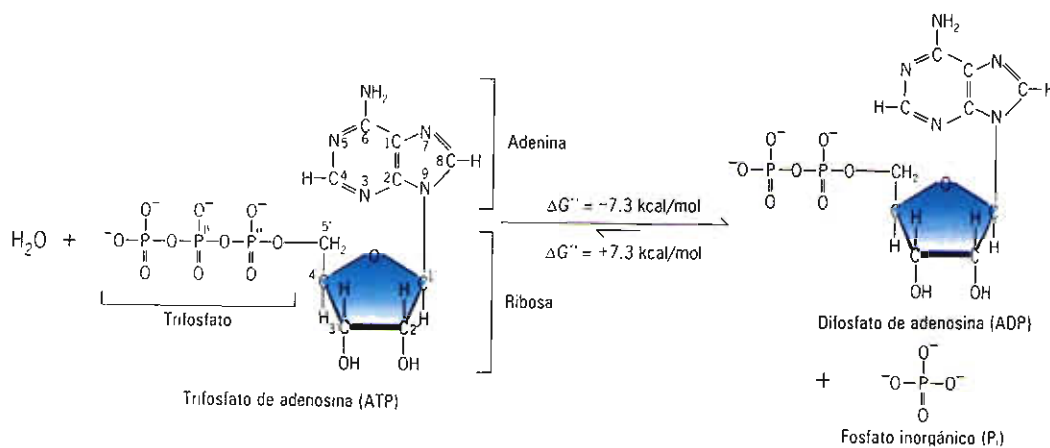
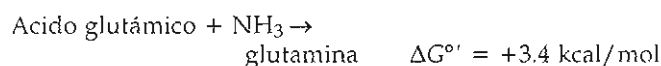


FIGURA 3-5. Hidrólisis del ATP. Como parte de muchos procesos bioquímicos se hidroliza el trifosfato de adenosina (ATP). En casi todas las reacciones, como la que se muestra aquí, el ATP se hidroliza para formar ADP y fosfato inorgánico (P_i), pero en algunos casos (no mostrados) se hidroliza para formar AMP, un compuesto con un solo grupo fosfato y pirofosfato (PP_i). Ambas reacciones tienen prácticamente la misma ΔG° de -7.3 kcal/mol.

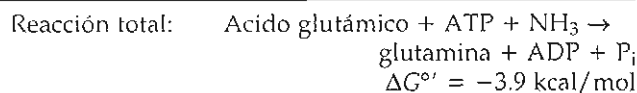
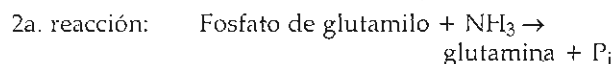
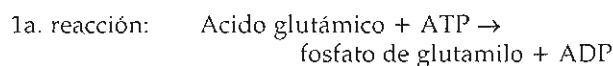
una característica importante del metabolismo celular; a saber, las reacciones específicas no pueden considerarse de manera independiente como si ocurrieran aisladas en un tubo de ensaye. Cientos de reacciones ocurren de manera simultánea dentro de una célula. Todas se relacionan entre sí porque el producto de una reacción es el sustrato para la siguiente reacción de la secuencia, y así sucesivamente a lo largo de una vía metabólica y en las subsecuentes. Para mantener la producción de gliceraldehído 3-fosfato a expensas del fosfato de dihidroxiacetona, la reacción debe ocurrir de modo que la siguiente reacción de la secuencia elimine el producto a una velocidad bastante rápida para conservar una relación favorable entre las concentraciones de estas dos moléculas.

Acoplamiento de reacciones endergónicas y exergónicas

Las reacciones con valor positivo alto ΔG° , en condiciones típicas se "inician" por ingreso de energía. Consideremos la formación del aminoácido glutamina a partir de ácido glutámico:



Esta reacción aparentemente endergónica tiene lugar en la célula porque la formación de glutamina a partir de ácido glutámico ocurre en dos reacciones secuenciales, ambas favorecidas:



Se dice que la formación de glutamina está **acoplada** a la hidrólisis de ATP. Puesto que ΔG para la hidrólisis de ATP es más negativa en comparación con ΔG para la síntesis de glutamina a partir de ácido glutámico, que es positiva, se puede emplear la reacción de la hidrólisis de ATP "cuesta abajo" para iniciar la síntesis "cuesta arriba" de glutamina. Todo lo que se requiere para acoplar las dos reacciones químicas es que el producto de la primera reacción se utilice como sustrato para la segunda. El puente entre las dos moléculas, fosfato de glutamilo en este caso, se denomina **intermediario común**. Lo que en realidad ocurre es que la hidrólisis exergónica del ATP se lleva a cabo en dos pasos. En el primero, la glutamina actúa como aceptor del grupo fosfato, en tanto que en el segundo el agua se convierte en aceptor de fosfato y la hidrólisis se completa.

La hidrólisis del ATP puede usarse en las células para iniciar reacciones que conducen a la formación de moléculas como la glutamina, debido a que la concentración de ATP se mantiene en cifras 10^8 veces aproximadamente más altas (en relación con la concentración de ADP) de las que se encontrarían en el equilibrio. Podría esperarse que la concentración de ADP en el equilibrio fuera mucho mayor que la concentración de ATP, pero en realidad la mayor parte

de las células contienen concentraciones más altas de ATP que de ADP. Este es un punto crucial; lo importante no es la cantidad de ATP que una célula contiene, sino lo que interesa es su concentración relativa de ADP y de P_i . Si en el equilibrio una célula contiene una mezcla de ATP, ADP y P_i , no importaría cuánto ATP estuviera presente, sino la capacidad para ejecutar trabajo.

La hidrólisis del ATP se emplea para impulsar la mayor parte de los procesos endergónicos dentro de la célula, incluyendo reacciones químicas como la que acabamos de describir, separación de cargas a través de una membrana, concentración de un soluto, movimiento de las fibrillas de una célula muscular y generación de calor (fig. 3-6). En la

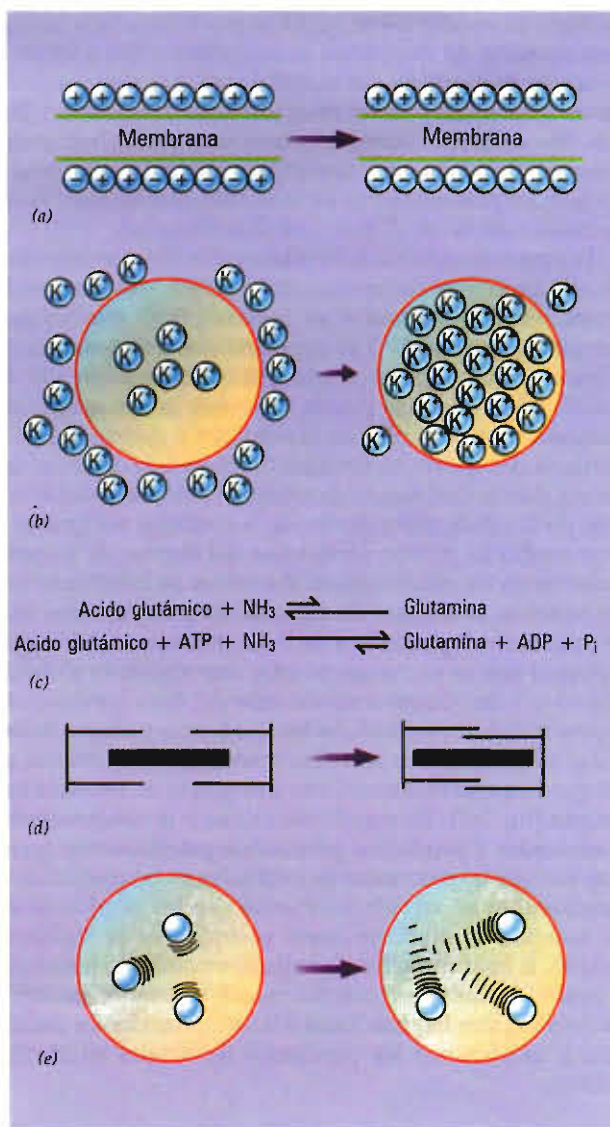


FIGURA 3-6. Algunas funciones de la hidrólisis del ATP. En la célula, el ATP se puede usar para: *a)* separar cargas a través de una membrana; *b)* concentrar un soluto particular dentro la célula; *c)* iniciar una reacción química desfavorecida; *d)* deslizar filamentos uno sobre otro, como ocurre durante el acortamiento de una célula muscular; *e)* aumentar la temperatura de la célula como resultado de un incremento de la velocidad de los movimientos moleculares.

mayor parte de las reacciones acopladas el grupo fosfato se transfiere del ATP a un aceptor (como el ácido glutámico, un azúcar, o a menudo una proteína) y después, en un segundo paso, se elimina (como ejemplo, véase la fig. 4-42).

Equilibrio comparado con el metabolismo en estado estacionario

En tanto las reacciones tiendan hacia el equilibrio, la energía libre disponible para hacer trabajo disminuye hasta un mínimo y la entropía aumenta hasta un máximo. Por lo tanto, cuanto más alejada se mantenga una reacción de su estado de equilibrio, menor será la pérdida de su capacidad para hacer trabajo causada por el incremento de entropía. El metabolismo celular es prácticamente un metabolismo en desequilibrio; o sea, se caracteriza por reacciones en desequilibrio de productos respecto de reactantes. Esto no significa ausencia de reacciones en equilibrio o cerca del mismo dentro de la célula. En realidad, muchas reacciones de una vía metabólica pueden estar próximas al equilibrio (fig. 3-24). Sin embargo, cuando menos una y con frecuencia varias reacciones de una vía se colocan lejos del equilibrio y esto las hace prácticamente irreversibles. Son las reacciones que conservan la vía al ir en una sola dirección.

Los principios básicos de la termodinámica se formulan utilizando sistemas *cerrados*, no vivos (sin intercambio de materia entre el sistema y su entorno), bajo condiciones de equilibrio reversible. Las características únicas del metabolismo celular requieren una perspectiva diferente. El metabolismo celular se puede mantener por sí mismo en condiciones irreversibles de desequilibrio debido a que, a diferencia del medio en un tubo de ensaye, la célula es un sistema *abierto*. Los materiales fluyen continuamente al interior de la célula procedentes de la corriente sanguínea o de un medio de cultivo. Lo extenso del ingreso de materia al interior de las células desde el exterior se manifiesta con sólo contener la respiración durante un minuto o dos. Minuto a minuto dependemos de la fuente externa del oxígeno porque éste es un reactante muy importante en el metabolismo celular. Como consecuencia del flujo continuo de oxígeno y de otros materiales hacia adentro y afuera de las células y las relaciones entre las reacciones bioquímicas, se dice que el metabolismo celular transcurre en **estado estacionario** (fig. 3-7). En estado estacionario la concentración de reactantes y productos permanece prácticamente constante, aunque las reacciones individuales no necesariamente se encuentren en equilibrio. Puesto que los productos de una reacción se emplean como sustratos de la siguiente reacción, la concentración de cada intermediario metabólico puede permanecer prácticamente constante en tanto nuevos sustratos lleguen hacia adentro procedentes del exterior y se eliminen los productos terminales en el otro extremo.

3-2 Enzimas

Justo antes de iniciarse el presente siglo, comenzó un acalorado debate acerca de si el proceso de formación de etanol requería o no la presencia de células intactas de levadura. Por un lado se encontraba el químico orgánico Justus von

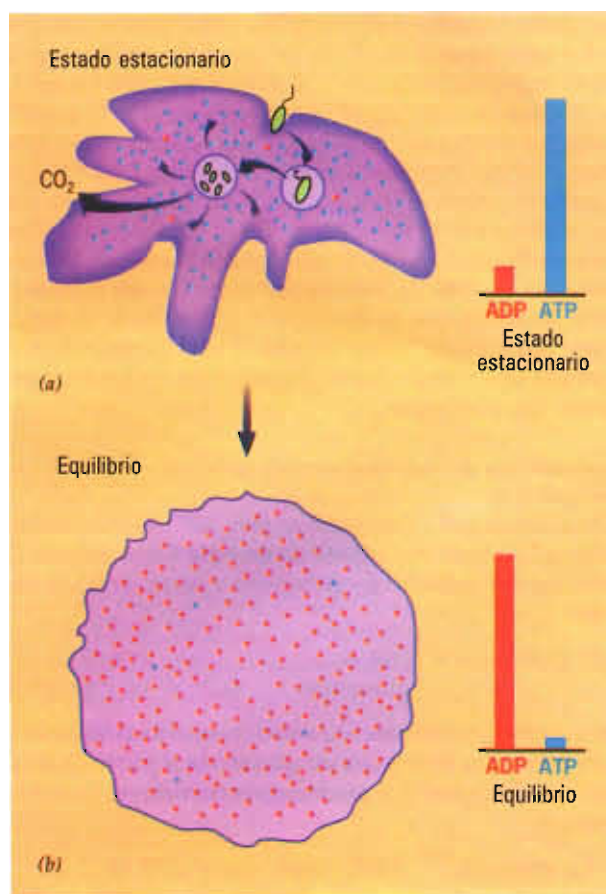


FIGURA 3-7 Estado estacionario en comparación con equilibrio. a) En tanto esta ameba pueda captar nutrientes procedentes del mundo exterior dispondrá de la energía necesaria para mantener la concentración de los compuestos en estado estacionario, que puede estar bastante lejos del equilibrio. Las concentraciones de ATP y ADP en el estado estacionario se indican por los puntos coloreados y el histograma. b) Cuando la ameba muere, las concentraciones de ATP y ADP (y también otras sustancias bioquímicas) tienden hacia sus proporciones de equilibrio.

Liebig, quien argumentaba que las reacciones de fermentación que producían alcohol no eran diferentes de las reacciones orgánicas estudiadas en un tubo de ensaye. Por otra parte, el biólogo Louis Pasteur opinaba que el proceso de fermentación sólo podía ocurrir en los confines de una célula viva intacta altamente organizada.

En 1897, dos años después de la muerte de Pasteur, el bacteriólogo Hans Büchner y su hermano, el químico Eduard, prepararon un "jugo de levaduras", extracto elaborado machacando células de levadura con granos de arena y luego filtrando la mezcla a través de papel filtro. Deseaban preservar el jugo de levaduras para uso posterior. Luego de fallar en sus intentos de preservar el extracto con antisépticos, intentaron proteger de la putrefacción la preparación añadiendo azúcar, el mismo procedimiento empleado para preservar jamones y compotas. En vez de preservar la solución, el jugo de levadura produjo gas a partir del azúcar y siguió burbujeando durante varios días. Luego de un nuevo análisis, Eduard descubrió que había ocurrido

una fermentación, produciendo etanol y burbujas de dióxido de carbono. Büchner había demostrado que la fermentación no requiere la presencia de células intactas. Sin embargo, pronto se observó que la fermentación era muy diferente de los tipos de reacción efectuados por los químicos orgánicos. La fermentación requiere la presencia de un conjunto único de catalizadores sin equivalentes en el mundo no vivo. A estos catalizadores se les denominó enzimas (que significa en griego “en la levadura”). Las enzimas son mediadoras del metabolismo encargadas prácticamente de toda reacción que ocurra en una célula. Sin enzimas, las reacciones metabólicas procederían tan lentamente que serían imperceptibles; en ausencia de enzimas, la vida sería imposible.

La primera demostración de que las enzimas eran proteínas fue lograda por James Sumner en 1926, cuando cristalizó la enzima ureasa de frijoles saltarines y determinó su composición. Aunque este dato no fue apreciado muy positivamente en aquella época, pronto se demostró que varias enzimas eran proteínas, y en los siguientes decenios se aceptó que todo catalizador biológico era una proteína. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que ciertas reacciones biológicas son catalizadas por moléculas de RNA. En aras de la claridad, todavía se reserva el término “enzima” generalmente para proteínas catalizadoras, en tanto que para los catalizadores de RNA se emplea el término “ribozima”.

Aunque las enzimas son proteínas, muchas son proteínas conjugadas; o sea, contienen elementos no proteínicos denominados **cofactores**, que pueden ser inorgánicos (metales) u orgánicos (**coenzimas**). Los cofactores participan de manera importante en la función de la enzima, y casi siempre cumplen tareas para las cuales los aminoácidos son inadecuados. Por ejemplo, como se analizó en el capítulo precedente, en la mioglobina el átomo de hierro del grupo hemo es el sitio donde se une y almacena el oxígeno hasta que el metabolismo celular lo requiera.

Propiedades de las enzimas

Como todo verdadero catalizador, las enzimas muestran las siguientes propiedades: 1) presentes en pequeña cantidad; 2) no sufren alteraciones irreversibles en el curso de la reacción, y por lo tanto cada molécula de enzima puede participar en muchas reacciones individuales, y 3) no tienen efecto sobre la termodinámica de la reacción. Este último punto tiene particular importancia. Las enzimas no determinan si una reacción es termodinámicamente favorable (exergónica) o desfavorable (endergónica) y tampoco determinan cuál es la relación en el equilibrio entre productos y reactantes. Estas son propiedades inherentes de los reactantes químicos. Como catalizadores, las enzimas sólo pueden acelerar la velocidad de una reacción química termodinámicamente favorecida.

No hay una relación necesaria entre la magnitud de ΔG para una reacción particular y la velocidad de dicha reacción. La magnitud de ΔG sólo informa de la diferencia de energía libre entre el estado inicial y el equilibrio. Es totalmente independiente de la vía o del tiempo que toma la reacción para alcanzar el equilibrio. Por ejemplo, considere-

mos la glucosa. La oxidación de este carbohidrato es un proceso termodinámicamente muy favorecido, según se puede determinar por la cantidad de energía liberada durante su combustión. Sin embargo, se pueden exponer al ambiente cristales de glucosa indefinidamente sin que ocurra una conversión notable en materiales menos energéticos. En otras palabras, la glucosa es *cinéticamente* estable, aunque sea inestable de manera termodinámica. Incluso si el azúcar estuviera disuelta, en tanto la solución se mantenga estéril no se deteriora con rapidez. Sin embargo, si se añaden unas pocas bacterias, en poco tiempo el azúcar sería captado por las células y sometido a degradación enzimática.

Las enzimas son catalizadores notablemente eficaces. Los catalizadores empleados por los químicos en el laboratorio, como calor, ácido, platino y magnesio metálicos, por lo general aceleran la reacción cien a mil veces en relación con la velocidad no catalizada. Por lo contrario, las enzimas incrementan típicamente la velocidad de una reacción un millón a un trillón de veces (10^{12}). Todavía más notable es que esto se logra a temperaturas y pH sumamente bajos presentes en la célula. Además, a diferencia de los catalizadores inorgánicos empleados por los químicos, la mayor parte de las enzimas son muy específicas en relación con los reactantes a los que pueden unirse y la reacción que catalizan. Los reactantes que se unen a una enzima se denominan **sustratos**. Por ejemplo, si la enzima hexocinasa está presente en una solución junto con cientos de compuestos de bajo peso molecular además del sustrato, la glucosa y sólo moléculas de glucosa se combinarán con la enzima y sufrirán la reacción (véase fig. 3-14). Para todo propósito práctico, las otras sustancias bien podrían estar ausentes. Este tipo de especificidad, sea entre enzima y sustrato o con otros tipos de proteínas y sustancias a las cuales se unen, es crucial para mantener el orden requerido para sustentar la vida.

Además de su elevado nivel de actividad y especificidad, las enzimas actúan como “directores del tráfico metabólico” en el sentido de que las reacciones catalizadas por enzimas son muy ordenadas: los únicos productos formados son los apropiados. Esto es muy importante, ya que la producción de compuestos no deseados rápidamente acabaría con la vida de una frágil célula. Por último, a diferencia de otros catalizadores, la actividad de las enzimas puede regularse para satisfacer necesidades particulares de la célula en un momento determinado.

Venciendo la barrera de la energía de activación

¿Cómo pueden las enzimas efectuar una catálisis tan eficaz? La primera cuestión que debe considerarse es por qué las reacciones favorables en forma termodinámica no proceden por sí mismas a velocidades relativamente rápidas en ausencia de enzimas. Incluso el ATP, cuya hidrólisis es tan favorecida, de hecho es estable dentro de la célula en tanto su descomposición ocurra en una reacción enzimática controlada. Si éste no fuera el caso, el ATP sería de poca utilidad para la célula.

Las transformaciones químicas requieren romper ciertos enlaces covalentes dentro de los reactantes. Para esto los reactantes deben contener suficiente energía cinética (energía de movimiento) que supere la barrera llamada **energía de activación**. Esto se expresa en el diagrama de la figura 3-8, donde la energía de activación está representada por la altura de la barrera. Con frecuencia la analogía es la de un objeto situado en lo alto de una roca listo para caer hacia abajo. Si depende de sus propios medios, es muy probable que el objeto permanezca allí de manera indefinida. Sin embargo, si ocurre algo que suministre al objeto energía suficiente para superar la fricción o cualquier otro pequeño obstáculo en su camino y que le ayude a alcanzar el borde de la roca, espontáneamente caerá hacia abajo; una vez activado, el objeto tiene la posibilidad de caer hasta un estado de menor energía.

En una solución a temperatura ambiente las moléculas existen en estado de movimiento al azar, y cada una posee cierta cantidad de energía en un instante dado. Entre la población de moléculas, su energía se distribuye siguiendo una curva en forma de campana (fig. 3-9), algunas poseen energía muy baja y otras muy alta. Las moléculas de alta energía ("moléculas activadas") permanecen como tales sólo durante breves periodos y pierden su exceso de energía al chocar con otras moléculas. Consideremos una reacción en la cual una molécula reactante se desdobla en dos moléculas de producto como en la figura 3-8. Si determinada molécula reactante adquiere suficiente energía para rebasar la barrera de activación, entonces es posible que se desdoble en dos moléculas de producto. La velocidad de reacción depende del número de moléculas reactantes con la energía cinética necesaria en cualquier momento dado. Una forma de incrementar la velocidad de reacción es aumentar la energía de los reactantes. Esto se logra con mayor

rapidez en el laboratorio calentando la mezcla de reacción. Por lo contrario, si se aplica calor a una reacción mediada por enzimas rápidamente se inactiva la enzima debido a su desnaturalización.

Cuando los reactantes se encuentran en la cresta de la onda de energía y listos para convertirse en productos, se dice que están en **estado de transición**. En este punto, los reactantes han formado un "complejo activado" transitorio en el cual se están formando y rompiendo enlaces. A diferencia de la energía libre estándar para una reacción, la energía de activación no tiene valor fijo, sino más bien varía con el mecanismo particular de reacción utilizado para alcanzar el estado de transición. Algunas vías requieren menos energía que otras; las enzimáticas son las que menos la requieren. Por consiguiente, a diferencia de la catálisis por calor, las enzimas aumentan grandemente la reactividad del sustrato sin elevar demasiado los niveles de energía. En otras palabras, las enzimas catalizan reacciones disminuyendo la magnitud de la barrera de energía de activación. En la figura 3-9 se compara el porcentaje de moléculas capaces de reaccionar en una reacción catalizada por enzimas y en una reacción no catalizada.

Sitio activo y especificidad molecular

Como catalizadoras, las enzimas aceleran el proceso de formación y rompimiento de enlaces. Para cumplir esta tarea las enzimas deben participar estrechamente en las actividades que tienen lugar entre los reactantes. Las enzimas forman un complejo con los reactantes, llamado **complejo enzima-sustrato (ES)** (fig. 3-10, a). En muchos casos, la asociación entre enzima y sustrato es de naturaleza no covalente, aunque se conocen muchos ejemplos en los cuales se forma un enlace covalente transitorio.

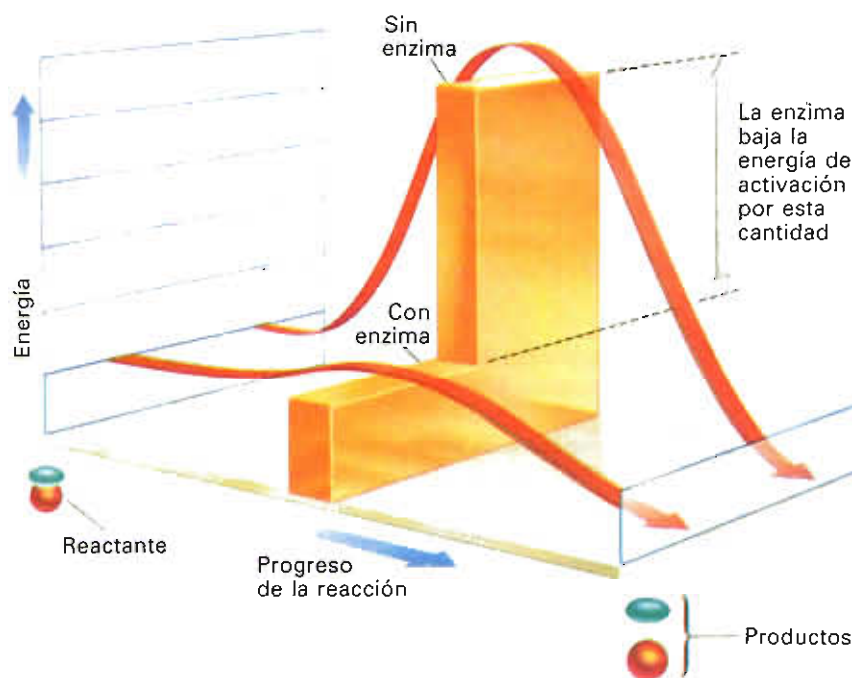


FIGURA 3-8. Energía de activación y reacciones enzimáticas. Aunque una reacción puede ser termodinámicamente favorecida, los reactantes deben poseer suficiente energía para alcanzar un estado de activación en el cual pueda ocurrir el reordenamiento atómico necesario para la reacción. La cantidad de energía requerida se denomina energía de activación (E_A) y está representada por la altura de la barrera. La energía de activación se reduce mucho cuando los reactantes se combinan con una enzima catalizadora.

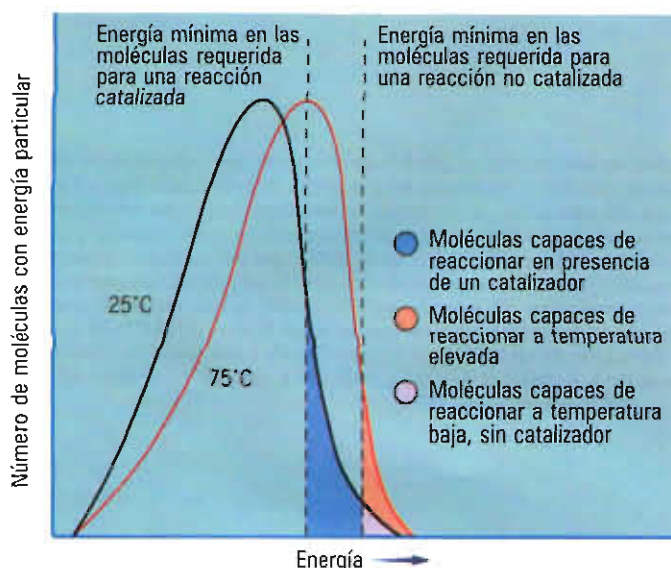


FIGURA 3-9. Efecto del descenso de energía de activación sobre la velocidad de una reacción. Las curvas en forma de campana indican el contenido de energía de una población de moléculas presente en una mezcla de reacción. El número de moléculas reactantes que contienen energía suficiente para sufrir la reacción aumenta calentando la mezcla o añadiendo una enzima catalizadora. El calor aumenta la velocidad de reacción incrementando el contenido de energía de las moléculas, en tanto que la enzima hace lo mismo descendiendo la energía de activación requerida para que ocurra la reacción.

La parte de la molécula de la enzima directamente implicada en el enlace al sustrato se denomina **sitio activo**. El sitio activo y el sustrato(s) tienen formas complementarias que les permiten unirse con alto grado de precisión, como las piezas de un rompecabezas. Además de enlazarse al sustrato, el sitio activo contiene un arreglo particular de aminoácidos cuya presencia desciende la energía de activación requerida por el sustrato para sufrir la reacción (fig. 3-10, b).

Tipicamente, el sitio activo se localiza en una hendidura o grieta que va del entorno acuoso a la profundidad de la proteína. Los aminoácidos que constituyen el sitio activo de ordinario se ubican en sitios distantes a lo largo de la cadena del polipéptido extendido, pero se reúnen en estrecha proximidad cuando el polipéptido se pliega para adoptar su estructura terciaria final. La estructura del sitio activo no sólo explica la actividad catalizadora de la enzima, sino también su *especificidad* (fig. 3-11). Como se hizo notar antes, la mayor parte de las enzimas tienen capacidad para unirse sólo a uno o a un pequeño número de moléculas estrechamente relacionadas desde el punto de vista biológico.

Mecanismos de catálisis enzimática

¿Cómo puede una enzima hacer que una reacción ocurra miles de veces por segundo cuando esa misma reacción sólo puede ocurrir a velocidad indetectable en ausencia de

la enzima? En un sentido, la participación de una macromolécula grande en las interacciones entre sustancias de bajo peso molecular desplaza a estas sustancias fuera de la solución y las mantiene sobre la superficie de las grandes moléculas catalizadoras. Una vez allí, el sustrato puede ser afectado de varias maneras, como se describe a continuación.

Orientación del sustrato

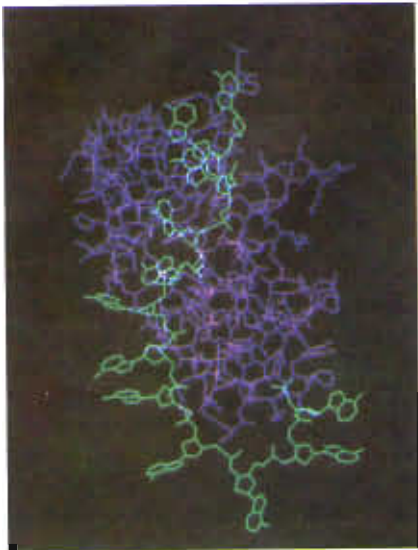
Supongamos que se coloca cierta cantidad de tuercas y tornillos en una bolsa y sacudimos la bolsa durante 15 minutos. *Es muy poco probable que alguna de las tuercas se enrosque firmemente en un tornillo al concluir el plazo.* Por lo contrario, si se toma un tornillo con una mano y una tuerca con la otra rápidamente se puede guiar el tornillo dentro de la tuerca. Lo mismo es cierto para enzimas y sustratos. Una vez que la enzima forma un complejo con el sustrato, las moléculas de sustrato pueden aproximarse mucho justo con la orientación apropiada para facilitar la reacción (fig. 3-12, a). A la inversa, los reactantes en solución son libres de sufrir movimientos de traslación y rotación e incluso moléculas con suficiente energía no necesariamente sufren una colisión que dé como resultado la formación de complejos en estado de transición.

Modificación de la reactividad del sustrato

Las enzimas se componen de aminoácidos provistos de una gran variedad de diferentes tipos de grupos R, desde aquellos con carga neta intensa hasta moléculas totalmente no polares. Una molécula de sustrato enlazada a la superficie de una enzima inevitablemente sufrirá influencia de los grupos R vecinos de la enzima (fig. 3-12, b). El efecto es activar al sustrato y estabilizar el complejo de transición. La activación del sustrato se logra sin ingreso de energía externa, por ejemplo calor. Varios mecanismos generales pueden incrementar la reactividad del sustrato luego que se asocia a una enzima. Estos mecanismos básicamente son similares a los caracterizados por los químicos cuando estudian el mecanismo de una reacción orgánica en un tubo de ensaye.

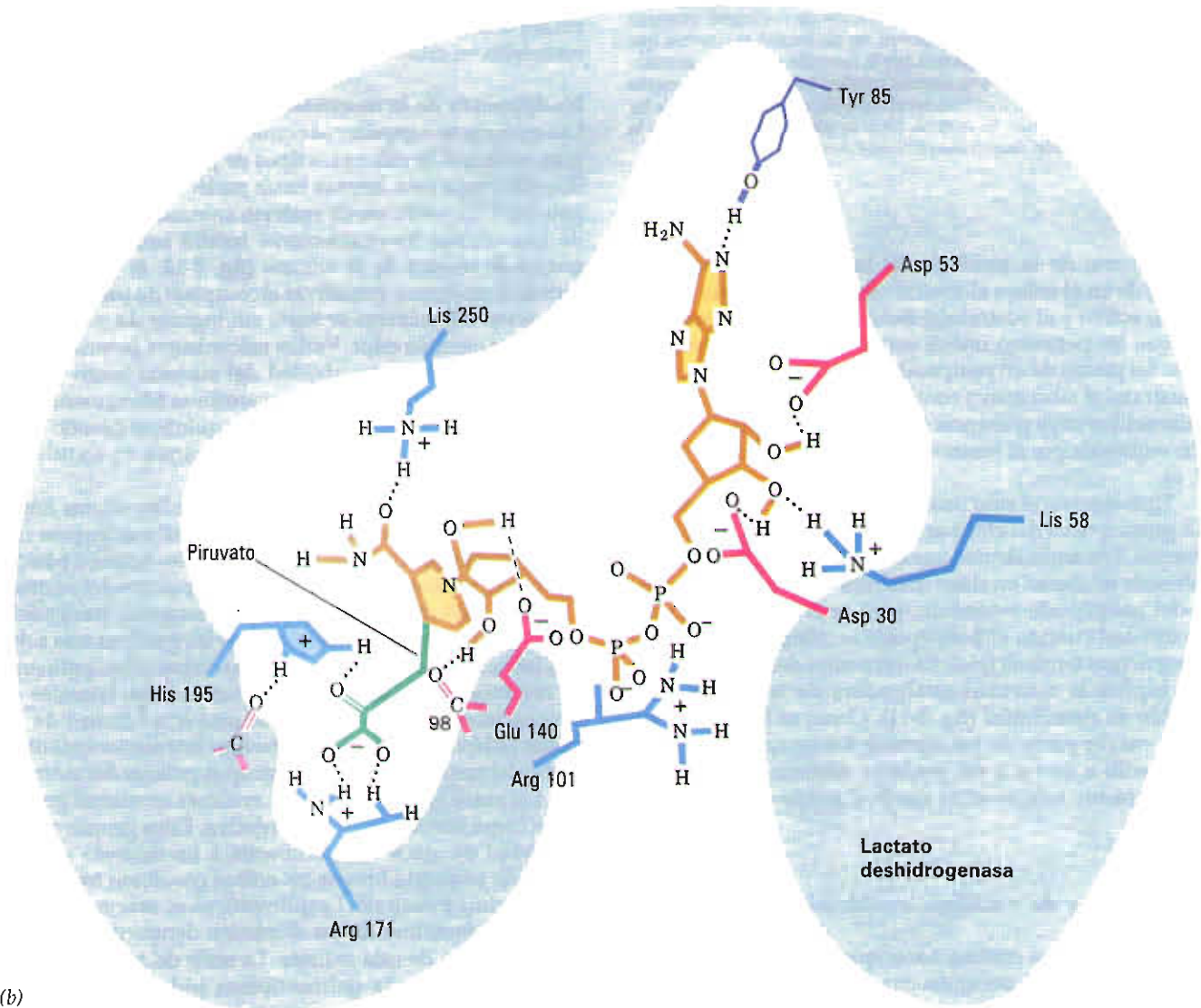
Por ejemplo, los cambios de pH pueden afectar intensamente la velocidad de reacción. Las enzimas poseen numerosos aminoácidos con cadenas laterales ácidas o básicas (grupos R) capaces de donar o aceptar protones del sustrato y por lo tanto de alterar la carga del sustrato, haciéndolo más reactivo. Puesto que el núcleo de las enzimas más solubles (situadas fuera de la membrana) consta principalmente de residuos no polares (pág. 53), las cadenas laterales de aminoácidos, ácidas o básicas, se proyectan dentro de regiones hidrofóbicas y pueden efectuar interacciones iónicas particularmente fuertes con los grupos polares del sustrato.

Los sitios activos de muchas enzimas contienen grupos R con carga parcial positiva o negativa. Estos grupos tienen capacidad de atacar químicamente a un sustrato y como resultado se puede formar un enlace covalente transitorio entre enzima y sustrato. La quimotripsina, una enzima que digiere las proteínas de los alimentos dentro del intestino delgado, actúa de esta manera. La serie de reacciones que ocurren conforme la quimotripsina hidroliza un enlace peptídico en una proteína sustrato se muestran en la figura



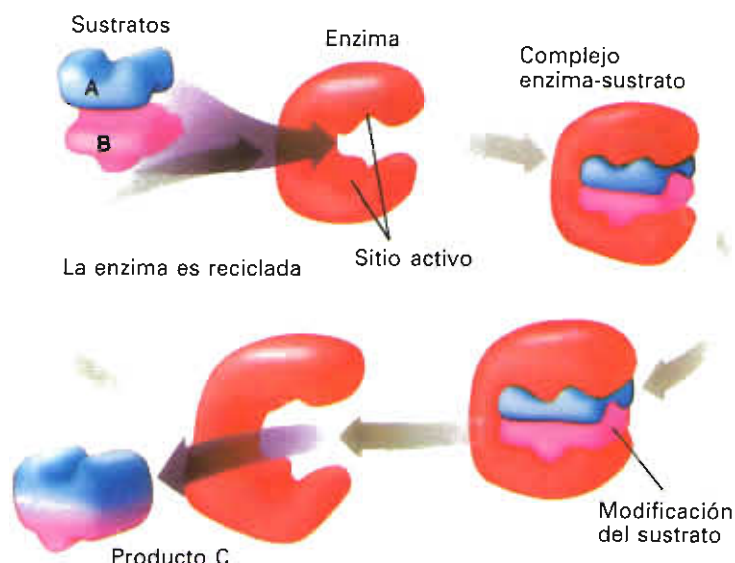
(a)

FIGURA 3-10. Sitio activo de una enzima. a) Modelo generado en una computadora de una molécula de RNA enlazada al sitio activo localizado en una grieta de la enzima ribonucleasa. b) Representación diagramática del sitio activo de la enzima lactato deshidrogenasa mostrando los diferentes sitios de interacción entre el sustrato enlazado (mostrado en color marrón) y ciertas cadenas laterales de aminoácidos de la enzima. Además de definir las propiedades del enlace al sustrato sobre el sitio activo, estas interacciones no covalentes alteran las propiedades del sustrato para acelerar la conversión a productos. (El sustrato aquí mostrado es una molécula sintética, llamada *S*-lac-NAD⁺, parecida al verdadero sustrato que es ácido láctico y NAD⁺. El análogo se empleó en estudios de difracción de rayos X de la enzima debido a que permanece enlazado a dicha enzima.) (a: Cortesía de S. Koszelek; b: según J.J. Holbrook y cols., en P.D. Boyer, ed., *The Enzymes*, 3a. ed., Vol. 11, p. 240, Academic Press, 1975.)



(b)

FIGURA 3-11. Esquema de una reacción catalizada por enzimas en la cual dos moléculas diferentes del reactante se unen para formar una sola molécula de producto. El sitio activo muestra una forma complementaria con las dos moléculas reactantes.



3-13. Los tres aminoácidos dentro del sitio activo de la enzima: serina, histidina y ácido aspártico, desempeñan un papel prominente. En la figura 3-13 se muestra la reacción en dos pasos. En el primer paso, el átomo de oxígeno electro-negativo de la cadena lateral de una serina de la enzima ataca al átomo de carbono del sustrato. En consecuencia, el enlace peptídico del sustrato se hidroliza y se forma una unión covalente entre la serina y el sustrato desplazando el resto del sustrato como uno de los productos. En el segundo paso, una molécula de agua rompe el enlace covalente entre enzima y sustrato, y la enzima retorna a su estado original no enlazada y libera el resto del sustrato como un segundo producto.

Induciendo tensión en el sustrato

Aunque el sitio activo de una enzima puede ser complementario con su sustrato(s), algunos estudios revelan un cambio en la posición relativa de algunos de los átomos de la enzima luego de la unión. Presumiblemente, una vez que la enzima se une al sustrato apropiado ocurre un cambio de conformación para mejorar la adaptación complementaria entre enzima y sustrato (**adaptación inducida**) y los grupos reactivos apropiados de la enzima se desplazan hacia el lugar donde puede ocurrir la reacción. En la figura 3-14 se da un ejemplo de cambio de conformación luego del enlace del sustrato. Una vez "agarrados" por la enzima, ciertos enlaces dentro de la molécula del sustrato sufren tensión física o electrónica, lo que debilita los enlaces y disminuye la energía necesaria para romperlos (fig. 3-12, c). Un ejemplo de este mecanismo se analiza en detalle en *La vía experimental* acerca de la enzima catalizadora lisozima, al final de este capítulo.

La capacidad de las enzimas para cambiar de forma y ejercer fuerzas sobre los sustratos ilustra una importante característica de estas moléculas: no son rígidas e inflexibles, más bien muestran una capacidad considerable de movimiento interno. Durante años se han descrito cambios de conformación en las enzimas mediante técnicas de di-

fracción de rayos X en las cuales la estructura de la enzima en estado no enlazado se compara con la estructura de la enzima cuando se une al sustrato dentro del sitio activo. Estas técnicas han producido los modelos mostrados en la figura 3-14. En años recientes se ha dispuesto de nuevas técnicas que permiten a los investigadores seguir verdaderamente los movimientos de las moléculas de una enzima conforme cataliza una reacción. Con una de estas técnicas se puede determinar el contorno de la superficie atómica de una sola molécula de enzima a medida que cataliza su reacción tomando "instantáneas" de la molécula cada 50 microsegundos mediante un microscopio de fuerza atómica (MFA). Con otra técnica, los cristales de la enzima (que todavía retiene actividad catalítica) se enfrían a temperaturas próximas a 40° del cero absoluto y luego se bombardean con un haz sumamente intenso de rayos X. El enfriamiento de los cristales hasta esta temperatura hace más lenta la reacción por un factor mayor de 10 000 millones, lo que alarga el proceso de unión y liberación del sustrato a segundos en vez de nanosegundos o microsegundos, como ocurre de ordinario. Empleando este nuevo tipo de cristalografía, los investigadores esperan obtener imágenes de la molécula de la enzima en diferentes etapas de la reacción catalítica. Las primeras películas de rayos X producidas por esta técnica revelaron los cambios que ocurren conforme la proteína mioglobina que capta oxígeno se enlaza y libera una molécula de monóxido de carbono (véase fig. 2-39, b).

Cinética enzimática

Ya vimos que la velocidad de una reacción química no es determinada por la energía libre de reactantes y productos (la ΔG de la reacción) sino por la capacidad de una enzima particular para descender la barrera de la energía de activación. Diferentes tipos de reacción suministran distintos tipos de barreras y como consecuencia las enzimas varían mucho en su capacidad para catalizar reacciones. La activi-

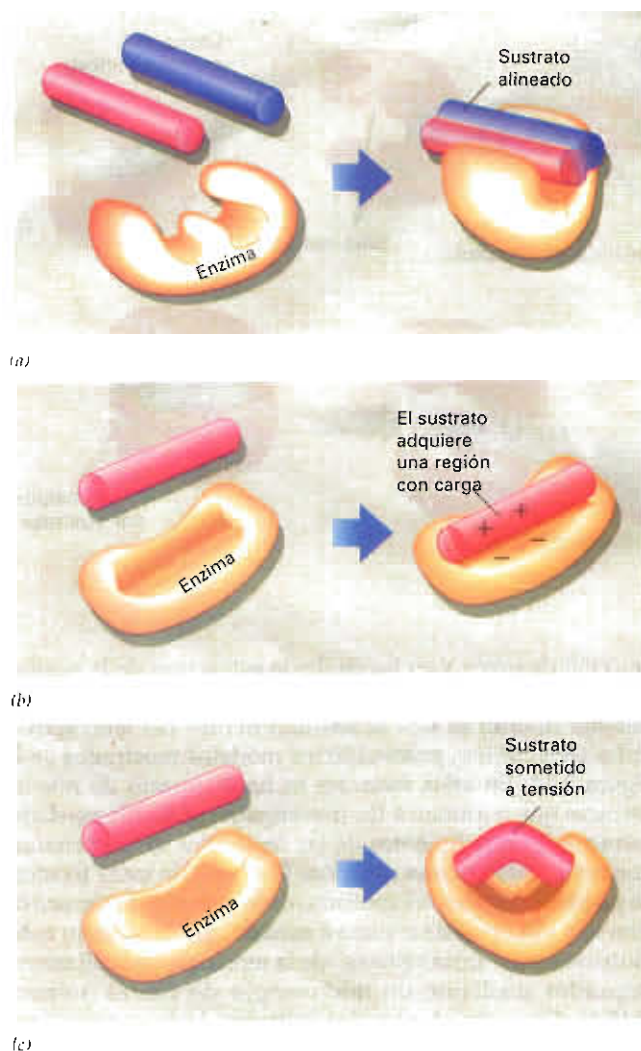


FIGURA 3-12. Tres mecanismos enzimáticos para acelerar reacciones: a) mantener al sustrato en una orientación precisa; b) modificar la reactividad del sustrato alterando su estructura iónica; c) someter a los enlaces del sustrato a tensión física para desdoblarlos.

dad catalítica de una enzima puede conocerse estudiando su **cinética**, o sea, la velocidad de reacción en diferentes condiciones experimentales.

En 1913, Leonor Michaelis y Maud Menten publicaron la relación matemática entre concentración de sustrato y velocidad de reacción enzimática medida por la cantidad de producto formado (o de sustrato consumido) en determinado tiempo. Esta relación se puede expresar mediante la ecuación que genera una hipérbola, como se muestra en la figura 3-15. En vez de considerar aspectos teóricos de la cinética enzimática podemos obtener la misma curva de manera práctica, como se hace con cada enzima estudiada. Para determinar la velocidad de una reacción se incubaba a la temperatura deseada una mezcla que contenga todos los ingredientes requeridos, excepto uno, el cual inicie la reacción cuando se añada. Si al inicio de la reacción no se

encuentran productos en la mezcla, entonces la velocidad de aparición del producto suministra una medida de la velocidad de reacción. Hay factores que pueden complicar este procedimiento. Si el tiempo de incubación es muy prolongado, la concentración del sustrato se reduce en forma cuantitativa. Además, conforme aparecen los productos pueden volver a convertirse en sustrato mediante la reacción inversa, también catalizada por la enzima. En condiciones ideales, lo que se desea determinar es la **velocidad inicial**, o sea, la velocidad en el instante en que aún no se forma producto. Para obtener valores precisos de la velocidad inicial de la reacción se emplean periodos breves de incubación y técnicas sensibles de medición.

Para generar una curva como la que se muestra en la figura 3-15 se determina la velocidad inicial para una serie de mezclas incubadas que contienen la misma cantidad de enzima pero una concentración creciente de sustrato. De esta curva se puede concluir que la velocidad inicial de reacción varía notablemente con la concentración de sustrato. La base de este efecto reside en la capacidad de cada molécula de la enzima. Cada reacción catalizada requiere cierto tiempo que limita el número de reacciones que pueden catalizarse en determinado momento. Con concentraciones bajas de sustrato la enzima es capaz de trabajar a una velocidad más rápida que el número de colisiones eficaces a las cuales está sujeta. En otras palabras, la enzima “dispone de tiempo”; las moléculas del sustrato son las limitantes de la velocidad. Con concentraciones más altas de sustrato la enzima trabaja a su máxima capacidad, y está sujeta a más colisiones con moléculas de sustrato que puede convertir a producto. En concentraciones elevadas de sustrato la enzima se convierte en limitante de la velocidad. Por lo tanto, conforme crece la concentración de sustrato en la mezcla de reacción, la enzima se aproxima a un estado de **saturación**. En este punto teórico de saturación la velocidad se denomina **velocidad máxima** ($V_{\text{máx}}$).

Si se conocen el peso molecular y la concentración de la enzima en la mezcla de reacción, entonces se puede calcular el **número de recambios** para la enzima a partir de $V_{\text{máx}}$. Este número de recambios es el número máximo de moléculas de sustrato que una molécula de enzima puede convertir en producto cada minuto. El número de recambio típico de las enzimas es 1 000, aunque se conocen valores tan grandes como 10^7 (para la anhidrasa carbónica). A partir de estos valores se nota que unas pocas moléculas de enzima pueden convertir con suma rapidez una cantidad relativamente grande de moléculas de sustrato en producto.

El valor de $V_{\text{máx}}$ sólo es un término útil obtenido a partir de una gráfica, como la mostrada en la figura 3-15; otro valor útil es la **constante de Michaelis** (K_M), que es igual a la concentración de sustrato cuando la velocidad de reacción corresponde a la mitad de $V_{\text{máx}}$ (fig. 3-15). En ciertos casos, según las velocidades relativas de formación y desdoblamiento del complejo enzima-sustrato, el valor de K_M proporciona una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato. Cuanto mayor sea el valor, menor será la afinidad; un valor típico de K_M es cercano a 10^{-4} M. En el cuadro 3-4 se consignan valores K_M para varias enzimas. Otros factores que influyen fuertemente en la cinética enzimática son pH y temperatura del medio de incubación. Cada

FIGURA 3-13. Mecanismo catalizador de la quimotripsina. La reacción se divide en dos pasos. *a)* El átomo de oxígeno electronegativo de un residuo de serina (Ser 195) de la enzima, que posee carga parcial negativa, efectúa un ataque (nucleofílico) sobre un átomo de carbono carbonilo provisto de carga parcial positiva, rompiendo la unión peptídica. La serina se vuelve más reactiva gracias a un residuo de histidina en íntima aposición que separa el protón de la serina y después dona el protón al átomo de nitrógeno del enlace peptídico desdoblado. Parte del sustrato forma un enlace covalente transitorio con la enzima por medio de la cadena lateral de serina, en tanto que el resto del sustrato se libera. (Nótese que los residuos serina e histidina están separados en la secuencia primaria por 138 aminoácidos, pero se juntan dentro de la enzima gracias al plegamiento del polipéptido. Un ácido aspártico, el residuo 102, que no se muestra, también desempeña un papel en la catálisis por influencia al estado iónico de la histidina.) *b)* En el segundo paso, el átomo de oxígeno electronegativo de la molécula de agua desplaza el sustrato unido mediante enlace covalente a la enzima y regenera la molécula de enzima no enlazada. Igual que en el primer paso, la histidina participa para transferir el protón; en este caso, el protón se elimina del agua y se transfiere al residuo serina de la enzima.

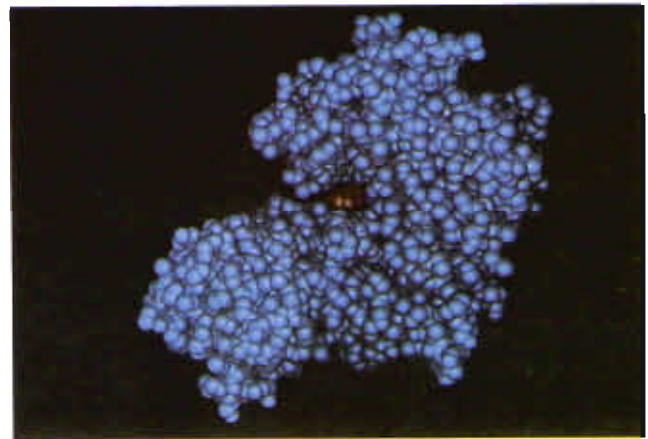
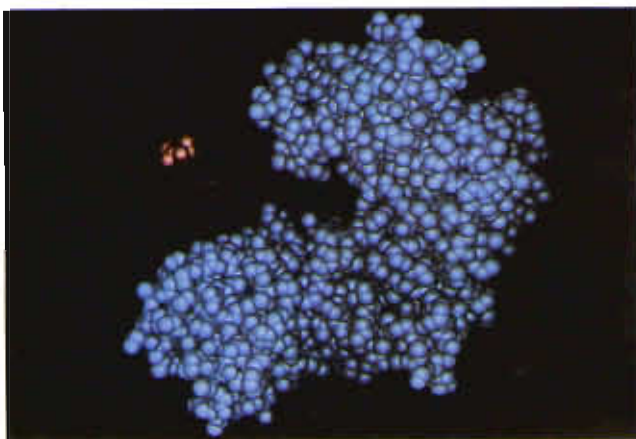
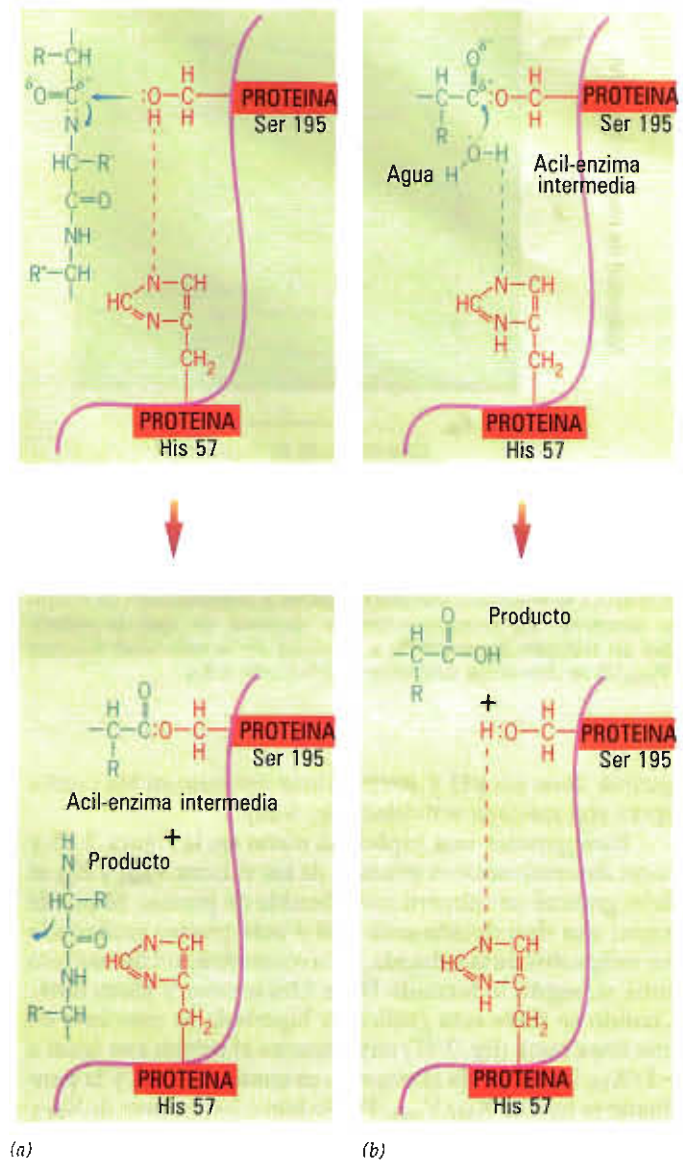


FIGURA 3-14. Ejemplo de adaptación inducida. El enlace de una molécula de glucosa a la enzima hexocinasa provoca un cambio de conformación mediante el cual la enzima atrapa al sustrato con mayor firmeza; se asume que esto incrementa la reactividad del sustrato. (Cortesía de Thomas A. Steitz.)

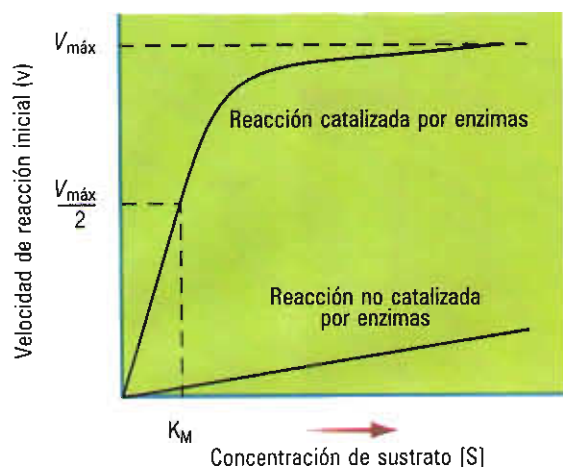


FIGURA 3-15. Relación entre la velocidad de una reacción catalizada por enzimas y la concentración del sustrato. Puesto que cada molécula de enzima sólo tiene capacidad para catalizar cierto número de reacciones en un tiempo determinado, la velocidad de la reacción se acerca a su velocidad máxima conforme la concentración de sustrato aumenta. La concentración de sustrato en que la velocidad de reacción corresponde a la mitad de la velocidad máxima ($V_{\text{máx}}/2$) se denomina constante de Michaelis o K_M .

enzima tiene un pH y temperatura óptimos en los cuales opera con máxima actividad (fig. 3-16).

Para generar una hipérbola como en la figura 3-15 y hacer determinaciones precisas de los valores $V_{\text{máx}}$ y K_M se debe graficar un número considerable de puntos. Se puede lograr una descripción más fácil y más precisa graficando los recíprocos de la velocidad y la concentración de sustrato entre sí, según lo formuló Hans Lineweaver y Dean Burk. Cuando se traza esta gráfica, la hipérbola se convierte en una línea recta (fig. 3-17) cuya abscisa al origen x es igual a $-1/K_M$, la ordenada al origen y es igual a $1/V_{\text{máx}}$ y la pendiente es igual a $K_M/V_{\text{máx}}$. Por lo tanto, los valores de K_M y $V_{\text{máx}}$ se pueden determinar con rapidez extrapolando la línea recta a partir de unos pocos puntos.

Inhibidores enzimáticos

Los **inhibidores enzimáticos** son moléculas con capacidad para enlazarse a una enzima y disminuir su actividad. La

célula depende de inhibidores para regular la actividad de gran parte de sus enzimas; los bioquímicos emplean inhibidores para estudiar las propiedades de las enzimas y muchas compañías bioquímicas producen inhibidores enzimáticos que actúan como fármacos, antibióticos o plaguicidas. Los inhibidores enzimáticos se pueden dividir en dos tipos: reversibles o irreversibles. A su vez, los inhibidores reversibles se pueden considerar competitivos o no competitivos.

Los **inhibidores irreversibles** son aquellos que se enlazan fuertemente a una enzima, a menudo formando un enlace covalente con alguno de sus residuos aminoácidos. Algunos gases nerviosos, como el diisopropilfosfofluoridato y los plaguicidas organofosforados actúan como inhibidores reversibles de acetilcolinesterasa, una enzima que desempeña un papel crucial para destruir acetilcolina, el neurotransmisor encargado de provocar la contracción muscular. Con la enzima inhibida, el músculo sufre estimulación continua y permanece en estado de contracción prolongada. Según se analiza en el ensayo *La perspectiva humana*, la penicilina debe su actividad antibiótica a su acción como inhibidor irreversible de una enzima clave para sintetizar la pared celular bacteriana.

Los inhibidores reversibles sólo se unen laxamente a la enzima, lo que permite desplazarlos con facilidad. Los **inhibidores competitivos** compiten con el sustrato por el acceso al sitio activo de una enzima. Puesto que los sustratos tienen estructuras complementarias para el sitio activo al cual deben enlazarse, los inhibidores competitivos deben parecerse al sustrato para competir por el mismo sitio de enlace, pero diferir de alguna manera para impedir que se transforme en producto (fig. 3-18). El análisis de los tipos de molécula que pueden competir con el sustrato por el sitio de enlace sobre una enzima suministra una idea de la estructura interior del sitio activo y la naturaleza misma de la interacción entre el sustrato natural y su enzima.

La eficacia de un inhibidor competitivo depende de su afinidad relativa por la enzima. No obstante, la inhibición competitiva se puede superar si la proporción sustrato/inhibidor es bastante grande. En otras palabras, si el número de colisiones entre la enzima y el inhibidor es insignificante en comparación con las colisiones entre la enzima y su sustrato, entonces el efecto inhibidor será mínimo. Con una concentración de sustrato lo bastante grande todavía es

CUADRO 3-4. Valores de K_M de varias enzimas

Enzima	Sustrato	K_M (M)
Acetilcolinesterasa	Acetilcolina	9.5×10^{-5}
Anhidrasa carbónica	CO_2	1.2×10^{-2}
	HCO_3^-	2.6×10^{-2}
Catalasa	H_2O_2	2.5×10^{-2}
Quimotripsina	N-Acetilglicina etiléster	4.4×10^{-1}
	N-Acetilvalina etiléster	8.8×10^{-2}
	N-Aciltirosina etiléster	6.6×10^{-4}
Fumarasa	Fumarato	5.0×10^{-6}
	Malato	2.5×10^{-5}
Ureasa	Urea	2.5×10^{-2}

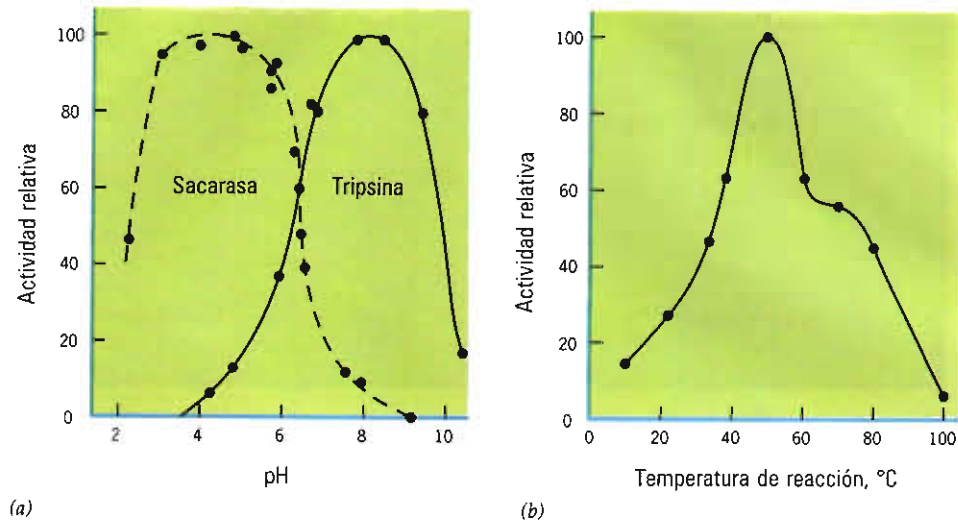


FIGURA 3-16. Dependencia de la velocidad de una reacción catalizada por enzimas sobre: a) pH y b) temperatura. La forma de las curvas, y el pH y la temperatura óptimos varían con la reacción particular. Los cambios del pH afectan las propiedades iónicas del sustrato y de la enzima, y también la conformación de ésta. A temperaturas más bajas la velocidad de reacción se eleva con los incrementos de temperatura debido al aumento de energía de los reactantes. A temperaturas más altas este aspecto positivo se contrarresta por la desnaturalización de la enzima. (a: Tomado de E.A. Moelwyn-Hughes, en *The enzymes*, J.B. Sumner y K. Myrback, eds., vol. 1, Academic press, 1950; b: de K. Hayashi y cols. *J. Biochem.* 64:93, 1968.)

teóricamente posible lograr la velocidad máxima de la enzima aun en presencia de un inhibidor competitivo.

En la **inhibición no competitiva**, sustrato e inhibidor no compiten por un sitio de enlace disponible; por lo general el inhibidor actúa en un sitio diferente del sitio activo de la enzima. El nivel de inhibición sólo depende de la concentración del inhibidor y no puede superarse incrementando la concentración del sustrato. Por lo tanto, en presencia de un inhibidor no competitivo, cierta fracción de las moléculas de la enzima están necesariamente inactivas en cualquier instante dado y no es posible alcanzar máxima velocidad en la población de moléculas de la enzima. Los efectos de la presencia de inhibidores no competitivos y

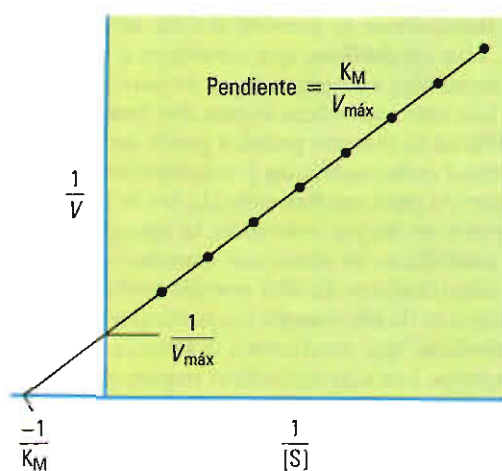


FIGURA 3-17. Gráfica de Burk-Lineweaver de los recíprocos de la velocidad y concentración del sustrato a partir de la cual se calculan con facilidad los valores $V_{\text{máx}}$ y K_M .

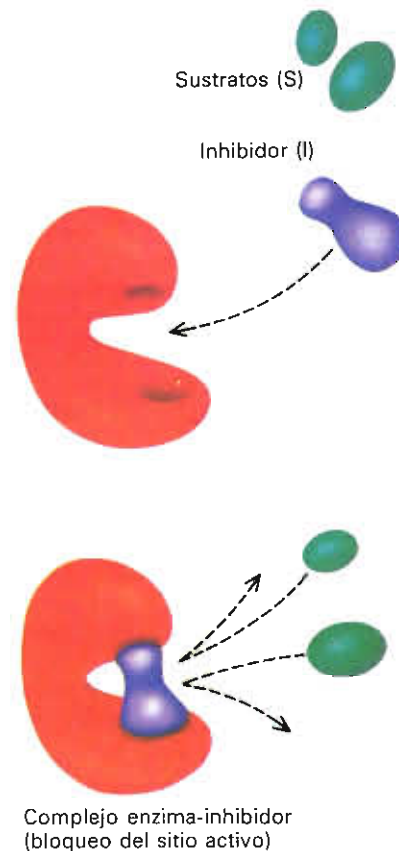


FIGURA 3-18. Inhibición competitiva. Debido a su similitud molecular, los inhibidores competitivos pueden competir con el sustrato por el sitio de enlace sobre la enzima. El efecto de un inhibidor competitivo depende de las concentraciones relativas del inhibidor y del sustrato.

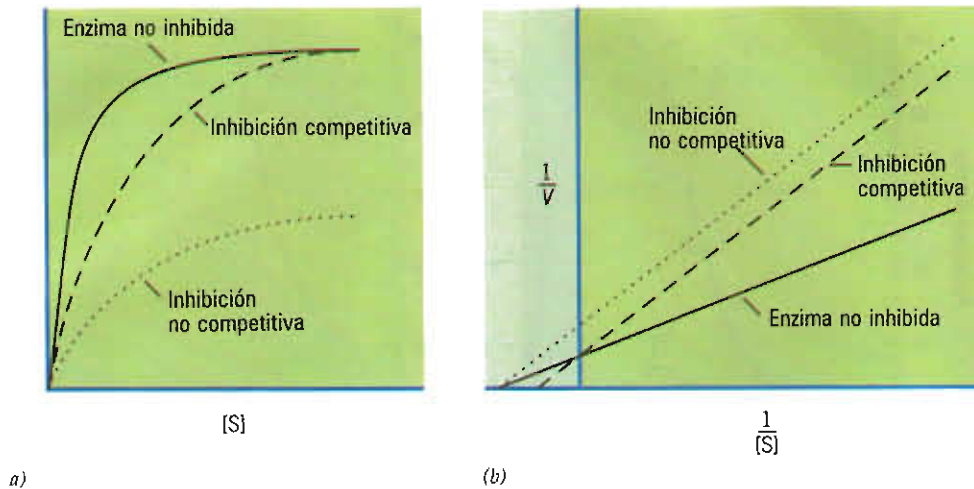
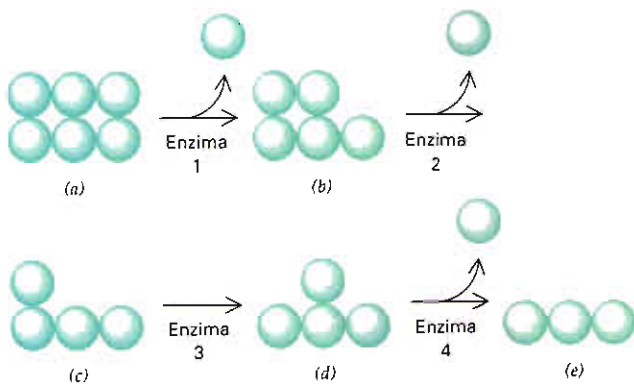


FIGURA 3-19. Efecto de los inhibidores sobre la cinética enzimática. El efecto de los inhibidores competitivos y los no competitivos se muestra al hacer una gráfica de la cinética de la reacción como velocidad de reacción contra concentración del sustrato (a) o como la recíproca; gráfica de Burk-Lineweaver (b). El inhibidor no competitivo reduce la $V_{\text{máx}}$ sin afectar la K_M , en tanto que el inhibidor competitivo aumenta la K_M sin afectar la $V_{\text{máx}}$.

competitivos sobre la cinética de las enzimas se muestran en la figura 3-19. En un caso, la $V_{\text{máx}}$ desciende y en el otro la K_M aumenta. En ambos tipos, la pendiente ($K_M/V_{\text{máx}}$) aumenta.

3-3 Metabolismo

Metabolismo es el conjunto de reacciones bioquímicas que ocurren dentro de una célula, el cual incluye gran diversidad de conversiones moleculares. Estas reacciones se pueden agrupar en **vías metabólicas** que contienen una secuencia de reacciones químicas, en las cuales cada reacción es catalizada por una enzima específica.



Las enzimas que constituyen una vía metabólica de ordinario se confinan a una porción específica de la célula, como las mitocondrias y el citoplasma. Cada vez hay más pruebas que sugieren que las enzimas de una vía metabólica están físicamente unidas entre sí, característica que permite entregar el producto de una enzima directamente como sustrato al sitio activo de la siguiente enzima en la secuencia de reacciones.

Los compuestos formados en cada paso a lo largo de la vía son **intermediarios metabólicos** (o **metabolitos**) que en último término conducen a la formación de un **producto final**. Los productos finales son moléculas con un papel particular en la célula, como un aminoácido que puede incorporarse a un polipéptido, o un azúcar que se puede consumir por su contenido energético. Las vías metabólicas de una célula están interconectadas en diferentes puntos, de modo que un compuesto generado en una vía se puede repartir en varias direcciones según las necesidades de la célula en ese momento. En esta sección nos centraremos en aspectos del metabolismo que conducen a la transferencia y empleo de la energía química dentro de la célula, porque insistiremos en este tema a lo largo de todo el libro.

Perspectiva general del metabolismo

Las vías metabólicas se pueden dividir en dos tipos muy amplios. **Vías catabólicas**, que conducen a la descomposición de moléculas complejas para formar productos más simples. Las vías catabólicas tienen dos funciones: poner a disponibilidad la materia prima a partir de la cual se pueden sintetizar otras moléculas y suministrar la energía química requerida para muchas actividades de la célula. Como estudiaremos en mayor extensión, la energía liberada por las vías catabólicas se almacena transitoriamente en dos formas: como fosfatos de alta energía (sobre todo ATP) y como electrones de alta energía (en particular en el NADPH). **Vías anabólicas**, que conducen a la síntesis de compuestos más complejos. Las vías anabólicas requieren energía y utilizan la energía química almacenada que se libera en vías catabólicas exergónicas.

La figura 3-20 muestra un perfil muy simplificado de la interconexión entre las principales vías anabólicas y las catabólicas. La descomposición de los materiales biológicos ocurre por pasos. Las macromoléculas primero se descom-

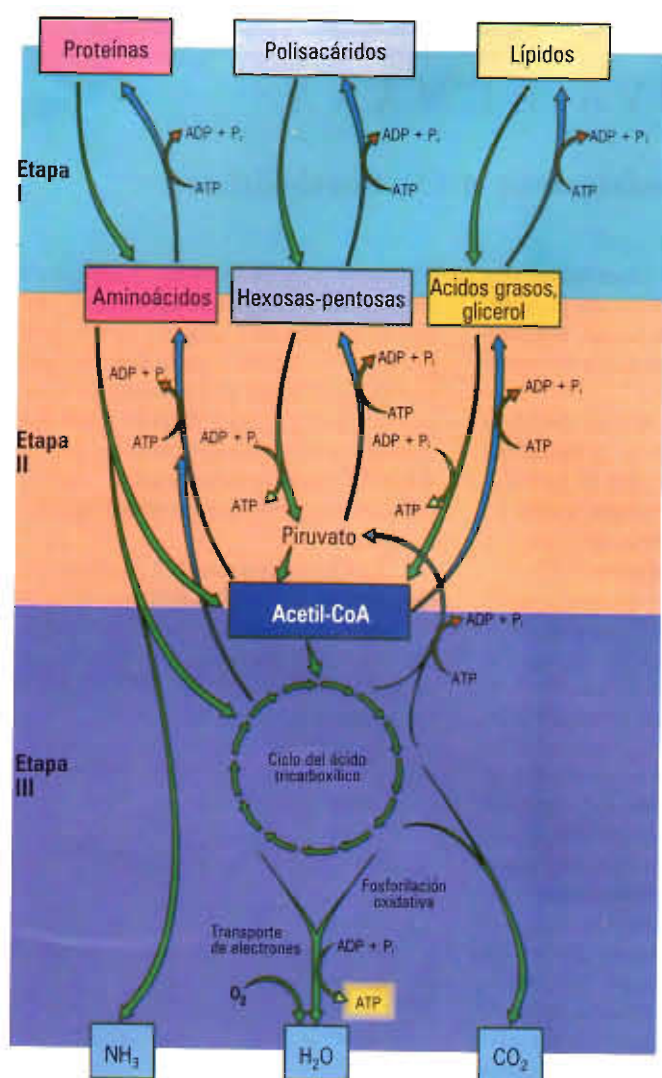


FIGURA 3-20. Las tres etapas del metabolismo. Las vías catabólicas (flechas verdes hacia abajo) convergen para formar metabolitos comunes y conducen a la síntesis de ATP en la etapa III. Las vías anabólicas (flechas azules hacia arriba) parten de unos cuantos precursores en la etapa III y utilizan ATP para sintetizar una gran variedad de materiales celulares. (Tomado de A.L. Lehninger, *Biochemistry*, 2a. ed., 1975 Worth Publishers, Nueva York.)

ponen (hidrólisis) en los bloques unitarios que las forman (etapa I, figura 3-20). Una vez hidrolizadas las macromoléculas en sus componentes (aminoácidos, nucleótidos, azúcares y ácidos grasos), la célula puede reutilizar los componentes directamente para formar otras macromoléculas de la misma clase, convertirlas en compuestos diferentes para elaborar otros productos o descomponerlos aún más (etapas II y III, figura 3-20) y extraer una parte de su contenido de energía libre. El curso que sigue depende de varios mecanismos reguladores sensibles a las necesidades de la célula en ese momento.

Las vías para la degradación de los diversos componentes de las macromoléculas varían según el compuesto particular que debe catabolizarse. Sin embargo, finalmente

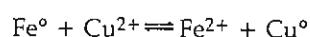
todas estas moléculas se convierten en una variedad de pequeños compuestos (etapa II, figura 3-20) que se metabolizan de manera similar. Así, aunque las sustancias empiezan como macromoléculas con estructuras muy diferentes a través de las vías catabólicas, se convierten en los mismos metabolitos de bajo peso molecular. Por esta razón, se dice que las vías catabólicas son convergentes.

Notablemente, las reacciones químicas y las vías metabólicas descritas en este capítulo se observan casi en toda célula viva, desde la bacteria más simple hasta el animal o vegetal más complejo. Es evidente que estas vías aparecieron muy pronto en la evolución de las células procariotas y se han retenido durante todo el curso de la evolución biológica.

Oxidación y reducción: cuestión de electrones

Ambas vías, catabólica y anabólica, incluyen reacciones clave en las cuales se transfieren electrones de un reactante al otro. Las reacciones que implican cambios en el estado electrónico de los reactantes se denominan **reacciones de oxidorreducción** (o **redox**). Los cambios de este tipo se acompañan de ganancia o pérdida de electrones. Consideremos la conversión del hierro metálico (Fe^0) al estado ferroso (Fe^{2+}). Esta conversión significa que el átomo de hierro pierde un par de electrones y por lo tanto alcanza un estado más positivo; cuando un átomo pierde uno o más electrones se dice que se **oxida**. La reacción es reversible. Los iones ferrosos se pueden convertir a hierro metálico, un estado más negativo, adquiriendo un par de electrones; cuando un átomo gana uno o más electrones se dice que se **reduce**.

Para que el hierro metálico se oxide debe haber alguna sustancia que acepte los electrones liberados. Por lo contrario, para que los iones ferrosos se reduzcan debe haber alguna sustancia que done los electrones necesarios. En otras palabras, la oxidación de un reactante debe acompañarse de la reducción simultánea de algún otro reactante, y viceversa. Una posible reacción en la cual participe el hierro podría ser



La sustancia que pierde electrones durante una reacción de oxidorreducción, o sea, la que se oxida, se denomina **agente reductor**, y la sustancia que gana electrones, o sea, la que se reduce, se denomina **agente oxidante**.

La oxidación o reducción de metales, como el hierro o el cobre, implica pérdida o ganancia de electrones íntegros. La oxidación y la reducción de sustratos orgánicos durante el metabolismo celular implica átomos de carbono enlazados en forma covalente a otros átomos. Según se analiza en el capítulo 2, cuando dos átomos diferentes comparten un par de electrones, los electrones por lo general son atraídos con mayor fuerza hacia uno de los dos átomos del enlace polarizado. En un enlace $\text{C}-\text{H}$, el átomo de carbono tira con mayor fuerza de los electrones, por lo que se puede decir que el átomo de carbono se encuentra en estado reducido. Por lo contrario, si un átomo de carbono está enlazado a un átomo más electronegativo como en los enlaces $\text{C}-\text{O}$

LA PERSPECTIVA HUMANA

El creciente problema de la resistencia a los antibióticos

No hace mucho tiempo era una idea bastante extendida que la salud del ser humano ya nunca más sería amenazada por infecciones bacterianas graves. Las enfermedades bacterianas, como tuberculosis, neumonía, gonorrea y docenas de otras más, ya no causarían más muertes gracias a la administración de cualquiera de numerosos antibióticos, compuestos que destruyen selectivamente a las bacterias sin provocar daño al huésped humano en el que se desarrollan dichas bacterias. En el decenio pasado fue muy doloroso reconocer que el anuncio del exterminio de las bacterias infecciosas fue prematuro. Bacterias alguna vez susceptibles a varios antibióticos presentan resistencia cada vez mayor a esos fármacos. El desarrollo de la resistencia bacteriana suministra un excelente ejemplo de selección natural; el uso ampliamente extendido de estos fármacos destruyó a las células susceptibles y dejó sobrevivir a los raros individuos capaces de resistirlos para repoblar las colonias. El resultado fue un notable cambio en la ocurrencia y virulencia de muchas enfermedades, incluyendo neumonía, tuberculosis y nuevas enfermedades causadas por bacterias, estafilococos y estreptococos. Los especialistas predicen que el problema de las enfermedades infecciosas se agudizará en los próximos años y las muertes por enfermedades alguna vez curables aumentarán notablemente. Aquí conside-

raremos brevemente el mecanismo de acción de los antibióticos, en particular los orientados a enzimas, tema de este capítulo, y al desarrollo de resistencia bacteriana.

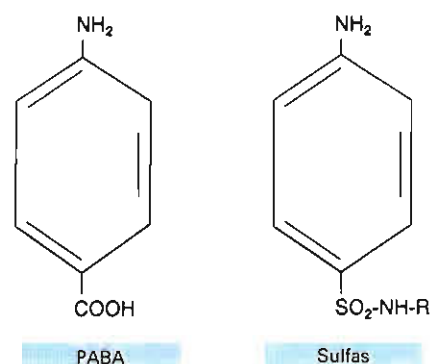
Los antibióticos trabajan debido a su capacidad para atacar actividades bacterianas sin afectar a las de las células eucariotas. En las células bacterianas son vulnerables varias actividades específicas. Entre éstas se incluyen:

1. *Enzimas que participan en la formación de la pared celular bacteriana.* La penicilina y sus derivados son análogos estructurales de los sustratos de una familia de transpeptidasas que catalizan la reacción final para formar enlaces cruzados que confieren a la pared celular sus propiedades protectoras. Si estas reacciones no ocurren, la pared celular se destruye. La penicilina es un inhibidor irreversible de las transpeptidasas; el antibiótico ocupa el sitio activo de la enzima y forma un complejo irreversible que no puede desplazarse. La vancomicina, que induce poca resistencia en la mayor parte de las bacterias, inhibe a una enzima que actúa en las primeras etapas de formación de la pared celular.

2. *Elementos del sistema mediante los cuales la bacteria duplica, transcribe y traduce su información genética.* Aunque las células procariotas y las eucariotas presentan un sistema similar de almacenamiento y empleo de la información genética, hay muchas di-

ferencias básicas entre los dos tipos de células, de las cuales se aprovechan los farmacólogos. Por ejemplo, la rifamicina es un antibiótico que inhibe selectivamente la RNA polimerasa, la enzima que transcribe el DNA en RNA. De manera similar, la estreptomycin y las tetraciclinas se enlazan a los ribosomas procariotas, pero no a los ribosomas eucariotas.

3. *Enzimas que catalizan reacciones metabólicas que ocurren específicamente en la bacteria.* Por ejemplo, las sulfas son antibióticos eficaces por su gran parecido con el compuesto ácido *p*-aminobenzoico (PABA),



que la bacteria convierte enzimáticamente en ácido fólico, una coenzima esencial. Puesto que el hombre carece de una enzima sintetizadora de ácido fólico, deben obtener esta coenzima

o C—N, los electrones son empujados con mayor fuerza para separarse del átomo de carbono, que por lo tanto se encuentra en estado oxidado. Puesto que el carbono tiene cuatro electrones en su capa más externa que puede compartir con otros átomos, puede existir en varios estados de oxidación. Esto se ilustra por el átomo de carbono en una serie de moléculas con un solo carbono (fig. 3-21) que van desde el estado completamente reducido en un metano (CH₄) hasta un estado completamente oxidado en el dióxido de carbono (CO₂). El estado de oxidación relativo de una molécula orgánica por lo general se puede determinar contando el nú-

mero de átomos de hidrógeno en comparación con los átomos de oxígeno y de nitrógeno por cada átomo de carbono. Como pronto veremos, el estado de oxidación de los átomos de carbono en una molécula orgánica constituye una medida del contenido de energía libre de la molécula.

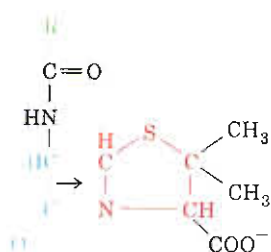
Captación y consumo de energía

Los compuestos que utilizamos como combustibles químicos para poner en marcha nuestros hornos y automóviles

indispensable en la dieta y por consiguiente las sulfas no tienen efecto en el metabolismo humano.

Las bacterias adquieren resistencia a los antibióticos mediante algunos mecanismos diferentes, muchos de los cuales se pueden ilustrar empleando como ejemplo la penicilina. Igual que la mayor parte de los antibióticos, la penicilina es un compuesto natural, o sea, producido normalmente por un organismo vivo, en este caso un hongo. La penicilina protege al hongo de bacterias patógenas de igual manera que protege (o alguna vez protegió) al ser humano. Las células bacterianas tal vez se han expuesto a compuestos similares a la penicilina durante cientos de millones de años, por lo que no es sorprendente que hayan desarrollado armas para defenderse contra esos compuestos.

La penicilina es un β -lactam, o sea, contiene un anillo β -lactam característico de cuatro miembros (mostrado por la flecha).



Desde 1940, los investigadores descubrieron que ciertas bacterias poseen una enzima llamada β -lactamasa (o penicilinasas) capaz de romper al

anillo lactam e inactivar al compuesto en relación con su actividad contra la bacteria. Durante la Segunda Guerra Mundial, época en que se introdujo la penicilina como antibiótico, ninguna de las principales bacterias patógenas poseía genes para sintetizar β -lactamasa. Esto se verificó examinando material genético de bacterias descendientes de cultivos de laboratorio iniciados en la era preantibiótica. En la actualidad, el gen β -lactamasa se encuentra en una gran variedad de bacterias infecciosas y la producción de β -lactamasa por estas células es la principal causa de su resistencia a penicilina.

La ocurrencia tan extendida de genes β -lactamasa ilustra con cuánta rapidez se pueden propagar los genes de una bacteria a otra, no sólo entre células de una especie determinada, sino entre diferentes especies. Hay varias formas en que esto puede ocurrir, incluyendo conjugación (mostrada en la figura 1-13), en la cual el DNA pasa de una célula bacteriana a otra; transducción, en la cual un virus transporta un gen bacteriano de una célula a otra; y transformación, en la cual una célula bacteriana es capaz de recoger del medio que la rodea un DNA desnudo. Los farmacólogos intentan contrarrestar la propagación de β -lactamasa sintetizando derivados de penicilina más resistentes a la enzima hidrolítica. Como es de esperarse, la selección natural rápidamente produce bacterias cuya β -lactamasa pueda inactivar las nuevas formas del antibiótico. Como hizo notar Julian Davies: "el cambio de una sola base en un gen que codifica una β -lactamasa bacteriana puede

causar pérdidas por 100 millones de dólares de esfuerzos en investigación farmacológica." Un método que alcanzó éxito limitado fue tratar pacientes con dos fármacos separados: un antibiótico parecido a la penicilina para inhibir la transpeptidasa y un inhibidor enzimático separado (p. ej., ácido clavulánico) para inhibir la β -lactamasa.

No todas las bacterias resistentes a penicilina poseen un gen β -lactamasa. Algunas son resistentes porque desarrollan modificaciones en su pared celular para bloquear la entrada del antibiótico; otras son resistentes porque tienen capacidad para expulsar selectivamente al antibiótico una vez que ha penetrado a la célula; incluso otras son resistentes debido a que poseen transpeptidasas modificadas que no se enlazan al antibiótico. Por ejemplo, la meningitis bacteriana causada por la bacteria *Neisseria meningitidis* todavía no ha demostrado que contiene β -lactamasa. Aun así, estas bacterias cada vez son más resistentes a la penicilina porque sus transpeptidasas van perdiendo su afinidad por los antibióticos. Comparando los genes que codifican transpeptidasas resistentes con genes que codifican a las correspondientes enzimas en cepas susceptibles (aisladas de cultivos iniciados en la era preantibiótica), se encuentran diferencias mayores en las secuencias de nucleótidos.

Los datos anteriores indican que las células bacterianas se vuelven resistentes a los fármacos, no como resultado de mutación genética, que produciría cambios genéticos mínimos, sino más bien al adquirir nuevos genes de otras especies.

son compuestos orgánicos altamente reducidos, como el gas natural (CH_4) y los derivados del petróleo. Cuando estos compuestos se queman en presencia de oxígeno se libera energía y los átomos se convierten a estados de mayor oxidación, como los gases dióxido y monóxido de carbono. El grado de reducción de un compuesto también se mide a partir de su capacidad para efectuar trabajo químico dentro de la célula. Cuanto mayor sea el número de átomos de hidrógeno que se puedan separar de una molécula "combustible", mayor será la cantidad de ATP que finalmente se forma. Los carbohidratos son ricos en energía química debi-

do a que contienen hileras de unidades ($\text{H}-\text{C}-\text{OH}$). Las grasas tienen mayor cantidad de energía por unidad de peso debido a sus hileras de unidades ($\text{H}-\text{C}-\text{H}$) más reducidas. En el siguiente análisis nos centraremos en los carbohidratos.

Como único componente, tanto del almidón como del glucógeno, la glucosa es una molécula clave en el metabo-

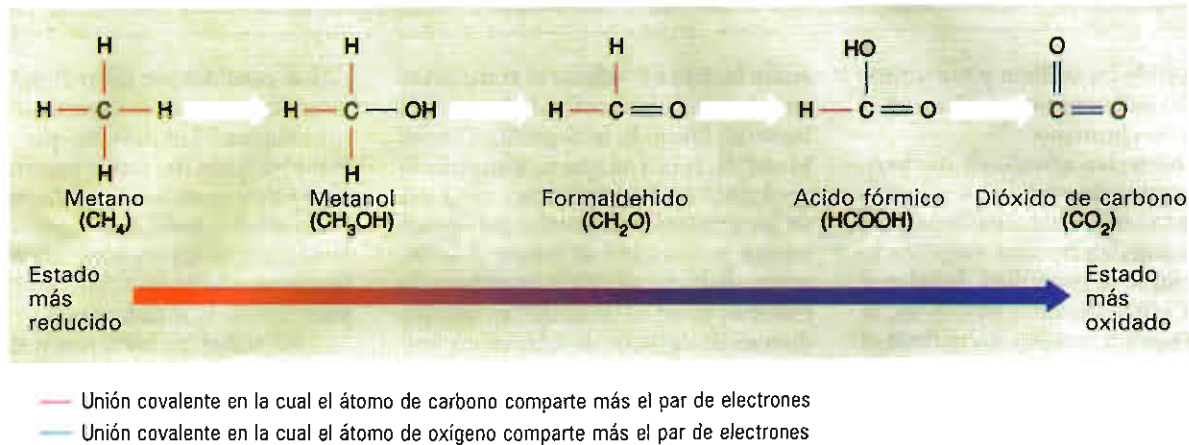
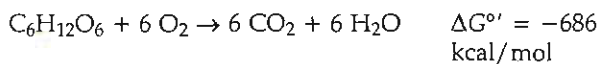


FIGURA 3-21. Estado de oxidación del átomo de carbono. El estado de oxidación de un átomo de carbono depende de los otros átomos a los cuales está enlazado. Cada átomo de carbono puede formar un máximo de cuatro enlaces con otros átomos. Esta serie de moléculas simples de un carbono ilustra los diferentes estados de oxidación en los cuales puede existir el átomo de carbono. En su estado más reducido, el carbono se enlaza a cuatro hidrógenos (formando metano); en su estado más oxidado se enlaza a dos oxígenos (para formar dióxido de carbono).

lismo energético tanto de plantas como de animales. La energía libre que se libera por oxidación completa de la glucosa es muy grande:



En comparación, la energía libre requerida para formar ATP a partir de ADP es relativamente pequeña:



De estas cifras es evidente que la oxidación completa de una molécula de glucosa para formar CO_2 y H_2O puede liberar bastante energía para formar ATP en gran cantidad. Como se verá en el capítulo 5, en las condiciones presentes

en la mayor parte de las células se pueden formar hasta más de 35 moléculas de ATP por molécula de glucosa oxidada. Para que esto ocurra, la descomposición de las moléculas de azúcar debe ocurrir en muchos pasos pequeños (fig. 3-22). Los pasos en los cuales la diferencia de energía libre entre reactivos y productos es relativamente grande se pueden acoplar a reacciones que conducen a la formación de ATP.

Básicamente hay dos etapas en el catabolismo de la glucosa que son casi idénticas en todos los organismos aerobios. La primera etapa, glucólisis, ocurre en la fase soluble del citoplasma (el citosol) y conduce a la formación de piruvato. La segunda etapa es el ciclo del ácido tricarboxílico (o ATC), que ocurre dentro de la mitocondria de las células eucariotas y el citoplasma soluble de los procariotes y que conduce a la oxidación final de átomos de carbono para producir dióxido de carbono. La mayor parte de la energía química de la glucosa se almacena en forma de electrones de alta energía eliminados de las moléculas del sustrato conforme se oxidan durante la glucólisis y el ciclo del ácido tricarboxílico. La energía de estos electrones es la que finalmente se conserva durante la formación de ATP. En las siguientes páginas nos centraremos en los pasos de la glucólisis, la primera etapa en la oxidación de la glucosa que ocurre sin participación de oxígeno. Concluiremos la historia de la oxidación de la glucosa en el capítulo 5, cuando estudiemos la estructura de las mitocondrias y su papel en la respiración aerobia.

Glucólisis y formación de ATP

Las reacciones de glucólisis y las enzimas que las catalizan se muestran en la figura 3-23. Antes de analizar las reacciones específicas se debe puntualizar lo relativo a la termodinámica del metabolismo. En un análisis previo se subrayó la diferencia entre ΔG y $\Delta G^{\circ'}$; la ΔG de una reacción particular determina su dirección en la célula. Mediciones reales de la concentración de metabolitos en la célula pueden revelar el valor de ΔG para una reacción en cualquier momento dado. La figura 3-24 muestra valores típicos de ΔG

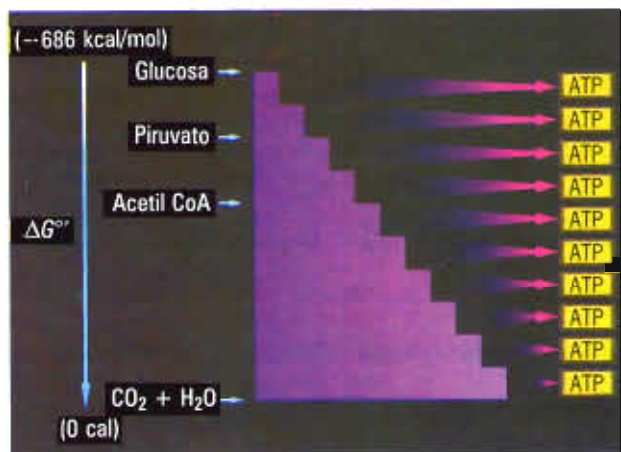


FIGURA 3-22. Formación de ATP durante el desdoblamiento oxidativo de la glucosa para formar CO_2 y H_2O . Esta figura ilustra la naturaleza gradual de la liberación de energía libre conforme los átomos de carbono de la molécula original de glucosa se oxidan paso a paso y por último se liberan como CO_2 . Una porción mayor de la energía libre liberada por oxidación se conserva en el ATP.

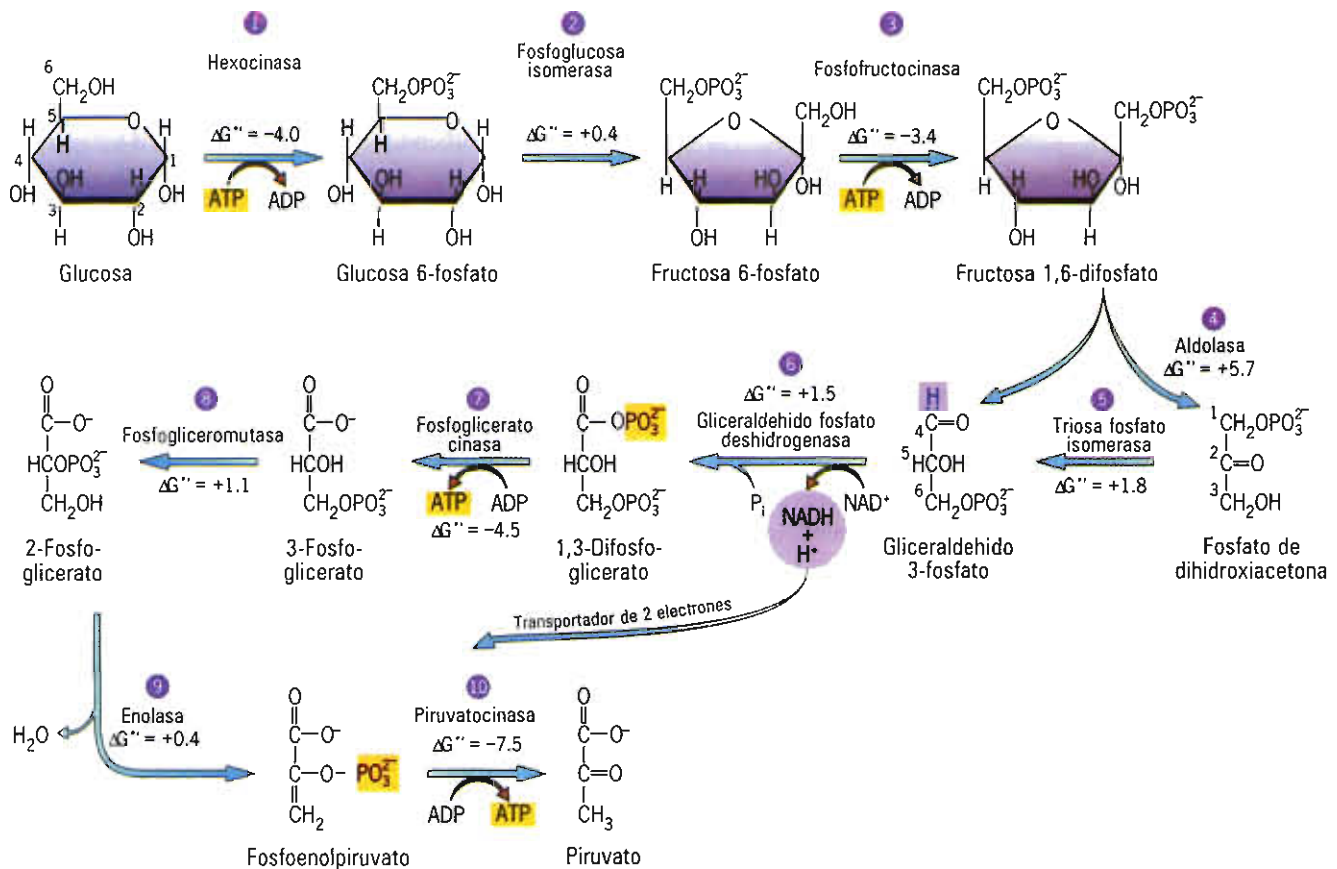


FIGURA 3-23. Pasos de la glucólisis.

medidos para reacciones de glucólisis. En contraste con los valores ΔG° de la figura 3-23, todas, menos tres reacciones, tienen valores ΔG cercanos a cero; o sea, están casi en equilibrio. Las tres reacciones separadas del equilibrio, que las hace prácticamente irreversibles en la célula, suministran la "fuerza impulsora" que conduce a los metabolitos a través de la vía glucolítica de manera determinada.

En 1905, dos químicos ingleses, Arthur Harden y William Young, estudiaron la descomposición de la glucosa por células de levadura, proceso que genera las burbujas del gas CO₂. Harden y Young notaron que el burbujeo al final se hacía más lento y se detenía, aun cuando hubiera abundante glucosa para metabolizar. Aparentemente, algún otro componente esencial del caldo de cultivo se estaba agotando. Luego de experimentar con algunas sustancias, los químicos observaron que añadiendo fosfato inorgánico la reacción se iniciaba otra vez. Concluyeron que la reacción agotaba el fosfato, primer indicio de que los grupos fosfato participaban en las vías metabólicas. La importancia del grupo fosfato se ilustra en la primera reacción de glucólisis.

La glucólisis se inicia con la unión del azúcar a grupos fosfato (paso 1, figura 3-23) a expensas de una molécula de ATP. El empleo de ATP en esta etapa se puede considerar una inversión de energía, el costo de meterse al negocio de la oxidación de la glucosa. La fosforilación activa el azúcar

y le confiere capacidad para participar en reacciones subsiguientes donde grupos fosfato lo rodean y lo transfieren a otros aceptores. La glucosa 6-fosfato se convierte en fructosa 6-fosfato y en seguida a fructosa 1,6-bisfosfato a expensas de una segunda molécula de ATP (pasos 2, 3). El difosfato de seis carbonos se separa en dos monofosfatos de tres carbonos (paso 4), que constituye la primera etapa de las reacciones exergónicas a las cuales se puede acoplar la formación de ATP.

El ATP se forma básicamente de dos maneras, ambas ilustradas por una reacción química de glucólisis: la conversión de gliceraldehído 3-fosfato a 3-fosfoglicerato (pasos 6 y 7, figura 3-23). La reacción completa es la oxidación de un aldehído para convertirlo en ácido carboxílico (como en la figura 3-21) y ocurre en dos pasos catalizados por dos enzimas diferentes (fig. 3-25). La primera de estas enzimas requiere un cofactor no proteínico (una coenzima), denominado dinucleótido de adenina nicotinamida (NAD), para catalizar la reacción. Como se verá en éste y en los siguientes capítulos, el dinucleótido de adenina nicotinamida desempeña un papel clave en el metabolismo energético porque acepta y dona electrones. La primera reacción (fig. 3-25, a,b) es una oxidorreducción, en la cual dos electrones y un protón (equivalente a un ion hidruro, :H⁻) se transfieren del gliceraldehído 3-fosfato (que entonces se oxida) al NAD⁺ (que se reduce). La forma reducida de la coenzima es NADH

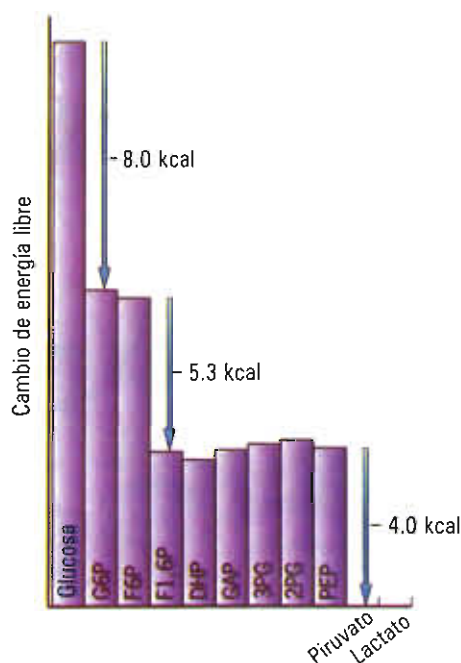


FIGURA 3-24 Perfil de la energía libre de la glucólisis en el eritrocito humano. Todas las reacciones están en equilibrio o cerca del mismo, excepto las catalizadas por hexocinasa, fosfofructocinasa y piruvatoquinasa, que muestran grandes diferencias de energía libre. En la célula, todas las reacciones deben proceder con disminución de la energía libre; el ligero incremento de energía libre mostrado aquí para varios pasos debe considerarse como derivado de errores en las mediciones experimentales de la concentración de metabolitos. (Tomado de A.L. Lehninger, *Biochemistry*, 2a. ed., 1975 Worth Publishers, Nueva York.)

(fig. 3-26). La enzima que cataliza este tipo de reacción se denomina **deshidrogenasa**; la que cataliza la reacción mencionada antes es la *gliceraldehído fosfato deshidrogenasa*. El NAD^+ derivado de la vitamina niacina actúa como coenzima asociada laxamente a la deshidrogenasa en posición para aceptar el ion hidruro (o sea, ambos electrones y el protón). A continuación el NADH formado en la reacción se libera de la enzima mediante intercambio con una molécula fresca de NAD^+ .

Volveremos a esta reacción en un momento, pero primero continuaremos con las consecuencias de la formación de NADH. El NADH se considera un compuesto de "alta energía" debido a la facilidad con que transfiere electrones a otras moléculas que atraen electrones. (Se dice que el NADH tiene potencial elevado para transferir electrones en relación con aceptores de electrones de las células, véase cuadro 5-2.) Los electrones se transfieren del NADH de ordinario mediante una serie de transportadores de electrones integrados a la membrana que constituyen una *cadena transportadora de electrones*. Conforme los electrones se desplazan a lo largo de esta cadena descienden a un estado de energía libre cada vez más bajo y por último pasan al oxígeno molecular reduciéndolo a agua. La energía liberada durante el transporte de electrones se utiliza para formar ATP a través de un proceso denominado *fosforilación oxidativa*. El

transporte de electrones y la fosforilación oxidativa se estudiarán en detalle en el capítulo 5.

Además de la ruta "indirecta" para formar ATP, que implica NADH y una cadena de transporte de electrones, la conversión de gliceraldehído 3-fosfato a 3-fosfoglicerato incluye una vía "directa" para sintetizar ATP. En el segundo paso de la reacción completa (fig. 3-25, c) se transfiere un grupo fosfato del 1,3-difosfoglicerato al ADP para formar una molécula de ATP. La enzima *fosfogliceratocinasa* cataliza la reacción. Esta ruta directa para formar ATP se conoce como **fosforilación a nivel de sustrato**, debido a que se transfiere un grupo fosfato del sustrato (en este caso, 1,3-difosfoglicerato) al ADP. La fosforilación a nivel del sustrato debe distinguirse de la formación de ATP que requiere una cadena de transporte de electrones.

La fosforilación de ADP a nivel de sustrato ilustra un punto importante acerca del ADP. Su síntesis *no es* endérgica; en otras palabras, el ATP no es una molécula tan energética que no pueda formarse con rapidez mediante reacciones metabólicas. Hay numerosas moléculas fosforiladas cuya hidrólisis tiene ΔG° más negativa en comparación con la de ATP. La figura 3-27 ilustra el ΔG° relativo para la hidrólisis de varios compuestos fosforilados. Se puede usar cualquier donador de la parte más alta de la lista para formar cualquier molécula situada más abajo en la lista. El ΔG° de esta reacción será igual a la diferencia entre los dos valores mostrados en la figura. Por ejemplo, ΔG° para transferir un grupo fosfato del 1,3-difosfoglicerato al ADP y formar ATP es igual a -4.5 kcal/mol ($-11.8 \text{ kcal/mol} + 7.3 \text{ kcal/mol}$). Este concepto de **potencial de transferencia** es útil para comparar cualquier serie de donadores y aceptores independientemente del grupo que se transfiera, sean protones, electrones, oxígeno o grupos fosfato. Las moléculas más altas de la lista, o sea aquellas con mayor energía libre ($-\Delta G^\circ$ mayor) son moléculas con *menos* afinidad para el grupo que se transfiere en comparación con las situadas más abajo en la lista. Cuanto menor afinidad, mejor será el donador; a mayor afinidad, mejor será el aceptor.

La formación de ATP no requiere tanta energía y puede formarse con rapidez mediante fosforilación a nivel de sustrato (o transporte de electrones); de igual modo, las reacciones metabólicas endérgicas, como la formación de glutamina, no requieren tanta energía que no puedan acoplarse a la hidrólisis de ATP. Así como se pueden fragmentar las vías catabólicas en pasos sucesivos más pequeños para conservar la energía en "paquetes" de ATP, de igual manera las vías anabólicas se pueden dividir en una serie de reacciones menos endérgicas que puedan iniciarse por hidrólisis de ATP.

Una característica importante de la glucólisis es que puede generar un número limitado de moléculas de ATP incluso en ausencia de oxígeno. Ni la fosforilación a nivel de sustrato del ADP por 1,3-difosfoglicerato, ni una reacción posterior por fosfoenolpiruvato (paso 10, figura 3-23) requieren cadena transportadora de electrones y oxígeno. Por lo tanto, la glucólisis se puede considerar una vía **anaerobia** para producir ATP, lo que significa que puede proceder en ausencia de oxígeno y continuar suministrando ATP. Durante la glucólisis, por cada molécula de gliceraldehído 3-fosfato oxidada a piruvato se producen dos moléculas de

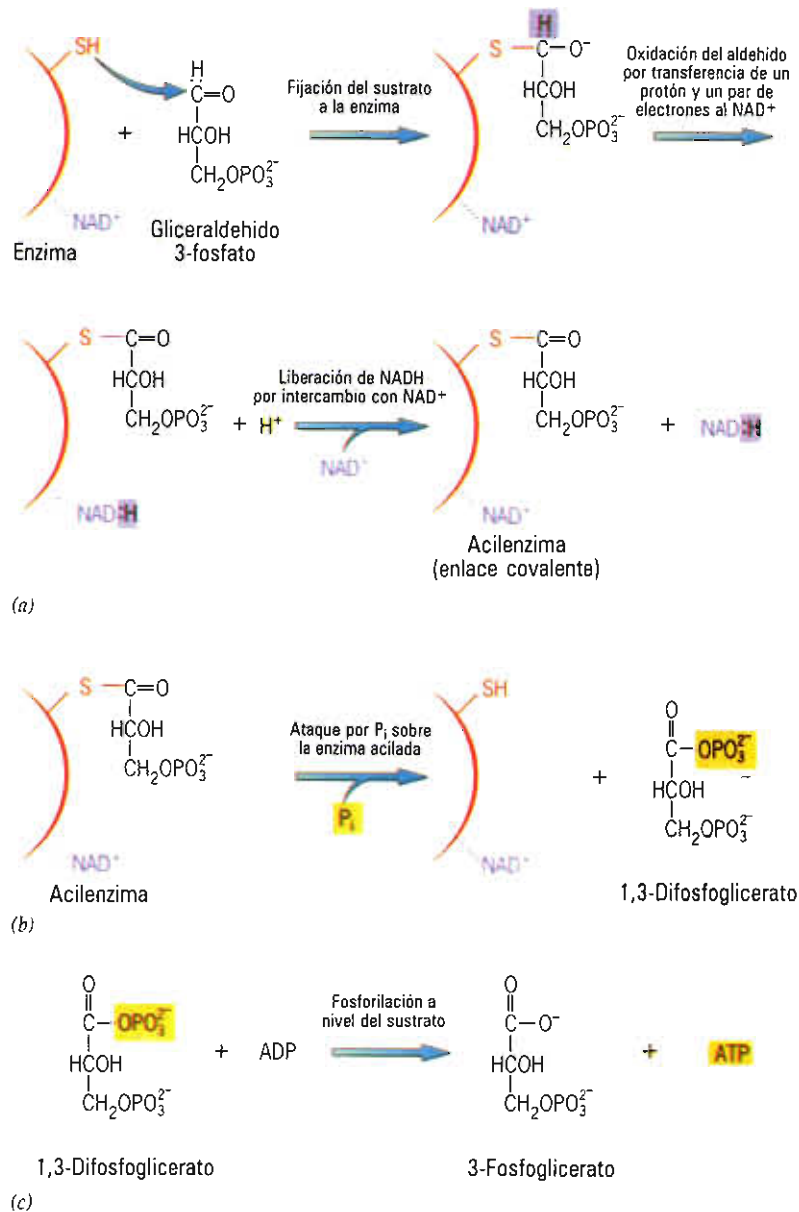
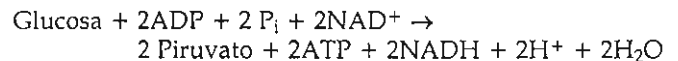


FIGURA 3-25. Transferencia de energía durante una oxidación química. La oxidación de gliceraldehído 3-fosfato a 3-fosfoglicerato, que es un ejemplo de la oxidación de un aldehído a ácido carboxílico, ocurre en dos pasos catalizados por dos enzimas. La primera reacción (partes a y b) es catalizada por la enzima gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, que transfiere un par de electrones del NAD^+ al NADH . Una vez reducidas, las moléculas NADH son desplazadas por las moléculas NAD^+ de la fase soluble del citoplasma. c) La segunda reacción, catalizada por la enzima fosfogliceratocinasa, es un ejemplo de fosforilación a nivel de sustrato en la cual un grupo fosfato se transfiere desde la molécula del sustrato, en este caso 1,3-difosfoglicerato, al ADP para formar ATP.

ATP por fosforilación a nivel de sustrato. Puesto que cada molécula de glucosa produce dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato, se generan cuatro moléculas de ATP por molécula de glucosa oxidada a piruvato. Por otra parte, se deben hidrolizar dos moléculas de ATP para iniciar la glucólisis. Esto genera una ganancia neta para la célula de dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa oxidada. La ecuación neta para la glucólisis se puede escribir



El piruvato, producto final de la glucólisis, es un compuesto clave porque se sitúa en el punto donde se unen las vías anaerobia (independiente de oxígeno) y aerobia (dependiente de oxígeno). En ausencia de oxígeno, el piruvato sufre fermentación; en presencia de oxígeno, se descompo-

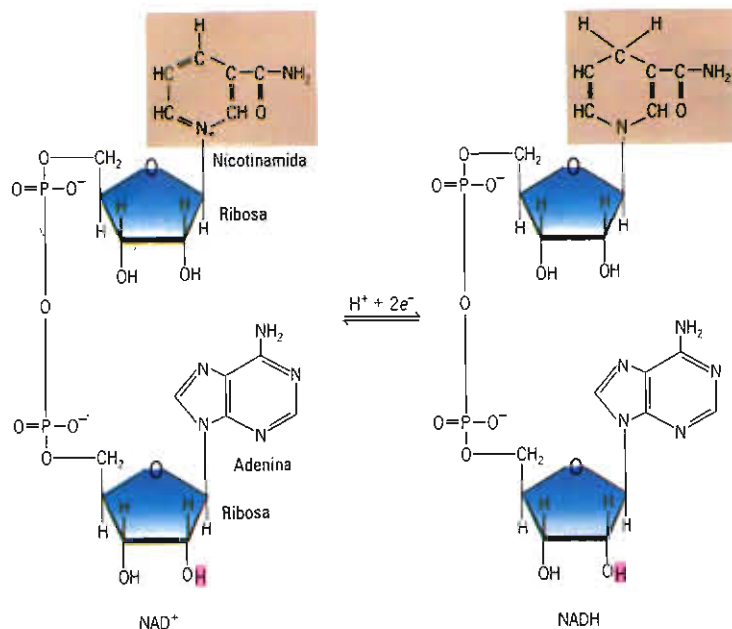


FIGURA 3-26. Estructura del NAD^+ y su reducción a NADH . [Cuando el 2' OH del fragmento ribosa (indicado por el recuadro de color púrpura) se enlaza en forma covalente al grupo fosfato, la molécula es $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, cuya función se analiza posteriormente en este capítulo.]

ne por respiración aerobia. Continuaremos este análisis de las vías metabólicas en el capítulo 5.

Poder reductor

La energía empleada para formar moléculas biológicas complejas, como proteínas, grasas y ácidos nucleicos, se deriva principalmente del ATP generado por la glucólisis y el transporte de electrones. Pero gran parte de estos materiales, en particular grasas y otros lípidos, están más reducidos

que los metabolitos a partir de los cuales se construyen. La formación de grasas requiere la formación de metabolitos, que se efectúa por transferencia de electrones de alta energía del NADPH , un compuesto de estructura similar al NADH , pero que contiene un grupo fosfato adicional (descrito en el pie de la figura 3-26). La reserva de NADPH de la célula representa su **poder reductor**, una importante medida del contenido de energía aprovechable en la célula. El empleo de NADPH se puede ilustrar por una de las reacciones clave de fotosíntesis:

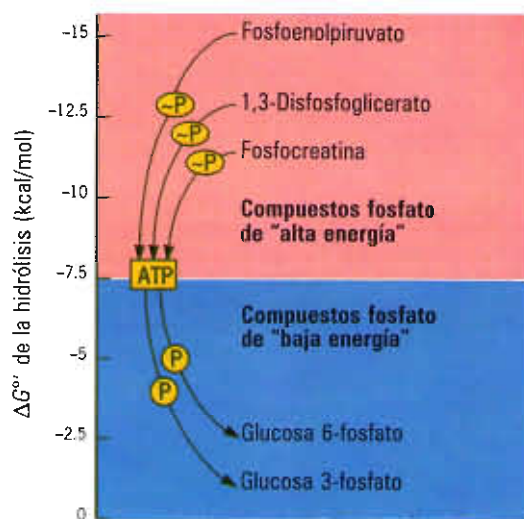
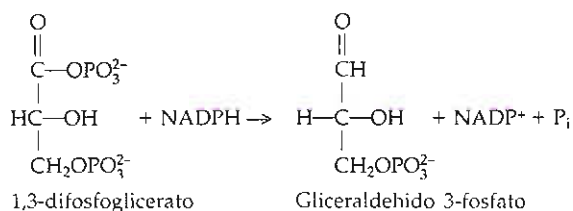
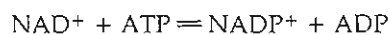


FIGURA 3-27. Clasificación de compuestos según su potencial para transferir fosfato. Los compuestos fosfato más altos en la escala (con mayor ΔG° de hidrólisis) tienen menor afinidad por su grupo fosfato que los compuestos situados abajo en la escala. Como resultado, los compuestos más altos en la escala transfieren con rapidez su grupo fosfato para formar compuestos situados más abajo en la escala. Así, se pueden transferir grupos fosfato desde 1,3-difosfato o fosfoenolpiruvato al ADP durante la glucólisis. (Nota: 1 kcal = 4.184 kJ.)



En esta reacción se transfiere un par de electrones (junto con un protón) del NADPH al sustrato 1,3-difosfoglicerato, reduciendo un átomo de carbono (indicado en rojo).

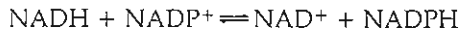
El NADP^+ , la forma oxidada del NADPH , se forma a partir de NAD^+ en la siguiente reacción:



A continuación se puede formar NADPH mediante reducción de NADP^+ . Igual que el NADH , el NADPH es un compuesto de "alta energía" debido a su elevado potencial de transferencia de electrones; la pérdida de electrones a partir de NADPH hacia un aceptor apropiado es una reacción muy favorecida. La transferencia de energía libre a través de estos electrones eleva el aceptor a un estado más energético, más reducido.

La separación del "poder reductor" en dos moléculas distintas pero relacionadas, NADH y NADPH , refleja una

separación de su papel metabólico primario. Diferentes enzimas reconocen al NADH y al NADPH como coenzimas. Las enzimas que tienen un papel reductor en las vías anabólicas reconocen al NADPH como su coenzima, en tanto que las enzimas que actúan como deshidrogenasas en las vías catabólicas reconocen al NAD⁺. Aunque se emplean de manera diferente, las dos coenzimas son interconvertibles. La enzima *transhidrogenasa* cataliza la reacción



Cuando la energía es abundante, la producción de NADPH es favorecida, lo que suministra el aporte de electrones necesarios para la biosíntesis de nuevas macromoléculas esenciales para el crecimiento. Sin embargo, cuando los recursos energéticos son escasos, la mayor parte de los electrones de alta energía del NADH se “cambian a monedas circulantes” de ATP y sólo se genera suficiente NADPH para satisfacer los requerimientos mínimos biosintéticos de la célula. Como resultado de esta regulación, un organismo integra sus procesos metabólicos a un “patrón de mercado” para satisfacer las necesidades del momento.

Regulación metabólica

La cantidad de ATP presente en una célula en un momento determinado es sorprendentemente pequeña. Por ejemplo, una célula bacteriana contiene aproximadamente un millón de moléculas de ATP cuya vida media es muy breve (entre uno y dos segundos). Con tan limitado suministro es evidente que el ATP no es una molécula para almacenar gran cantidad de energía libre. Las reservas energéticas de una célula se almacenan como polisacáridos y grasas. Cuando la concentración de ATP desciende se ponen en marcha las reacciones para incrementar la formación del mismo a expensas de formas almacenadas ricas en energía. De manera similar, cuando la concentración de ATP es alta se inhiben las reacciones que normalmente producen ATP. Las células tienen capacidad para regular estas importantes reacciones que liberan energía mediante el control de ciertas enzimas clave en algunas vías metabólicas.

Los cambios en la actividad de una enzima de ordinario se efectúan modificando la enzima de modo que se altere la forma de su sitio activo. Dos de los mecanismos más comunes para lograrlo son la modificación covalente y la modulación alostérica; ambas desempeñan un papel regulador clave en la oxidación de la glucosa.⁴

Alteración de la actividad de las enzimas mediante modificación covalente

A mediados del decenio de 1950, Edmond Fischer y Edwin Krebs, de la Universidad de Washington, estudiaron la *fosforilasa*, una enzima presente en células musculares que descompone el glucógeno en subunidades de glucosa. La enzima podía existir en sus formas activa e inactiva. Fischer

y Krebs prepararon un extracto crudo de células musculares y observaron que las moléculas de enzima inactiva del extracto podían convertirse en activas simplemente añadiendo ATP al tubo de ensaye. Un análisis posterior reveló una segunda enzima en el extracto, la “enzima convertidora”, como ellos la llamaron, que transfiere un grupo fosfato del ATP a uno de los 841 aminoácidos que constituyen la molécula de la fosforilasa. La presencia del grupo fosfato altera la forma del sitio activo en la molécula de la enzima e incrementa su actividad catalítica. Una investigación subsecuente demostró que la modificación covalente de las enzimas, según se ilustra por la adición de fosfatos, es un mecanismo general para activar (o inactivar) enzimas.

Las enzimas que transfieren grupos fosfato a otras proteínas se denominan **proteincinasas** y participan en la regulación de actividades tan diversas como la acción de hormonas, la división celular y la expresión de genes. Hay dos tipos básicamente diferentes de proteincinasas: un tipo añade grupos fosfato a residuos específicos de tirosina en una proteína de sustrato, el otro tipo añade fosfatos a residuos específicos de serina o treonina en el sustrato. Como se analiza en la sección 15-2, la activación de fosforilasa por la proteincinasa *fosforilasa cinasa* puede iniciarse incrementando la concentración de las hormonas glucagon y epinefrina circulantes.

Alteración de la actividad enzimática mediante modulación alostérica

La **modulación alostérica** es un mecanismo que puede inhibir o estimular la actividad de una enzima por medio de un compuesto que se enlaza a un **sitio alostérico**, el cual es un sitio especial distinto del sitio activo de la enzima. Igual que el colapso secuencial de una fila de dominios, la unión de un compuesto al sitio alostérico envía una “ondulación” a todo lo largo de la proteína que provoca un cambio definido en la forma del sitio activo, el cual puede localizarse en el lado opuesto de la enzima o incluso en un polipéptido diferente dentro de la molécula de la proteína. Según la enzima y el modulador alostérico particulares, el cambio en la forma del sitio activo puede estimular o inhibir su capacidad para catalizar la reacción. La modulación alostérica ilustra la íntima relación entre estructura molecular y función. Cambios muy pequeños en la estructura de la enzima inducidos por el modulador alostérico pueden causar modificaciones notables en la actividad enzimática.

Las células son muy eficaces para fabricar plantas que no desperdician energía ni materiales produciendo compuestos innecesarios. Uno de los principales mecanismos que emplea la célula para interrumpir el ensamblado en las líneas anabólicas es un tipo de modulación alostérica denominado **inhibición por retroalimentación**, en el cual la primera enzima de una vía metabólica se inactiva en forma transitoria cuando la concentración del producto final de dicha vía (por ejemplo, un aminoácido) se eleva. Esto se ilustra en la simple vía mostrada en la figura 3-28, en la cual dos sustratos, A y B, se convierten al producto final E. Conforme se eleva la concentración del producto E, éste se enlaza al sitio alostérico de la enzima BC y provoca un cambio de conformación en el sitio activo, que disminuye la actividad de la enzima. La inhibición por retroalimentación pro-

⁴ También se puede regular el metabolismo controlando la concentración de las enzimas. La velocidad relativa de síntesis y la degradación de enzimas se consideran en capítulos posteriores.

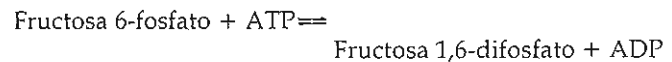
porciona un medio para que la célula ejerza control inmediato y sensible sobre la actividad anabólica de la célula.

Separación de las vías catabólica y anabólica

Un breve examen de la vía anabólica que conduce a la formación de glucosa (*gluconeogénesis*) ilustra algunos aspectos importantes acerca de las vías sintéticas. ¿Cómo se puede sintetizar glucosa a partir de piruvato en una célula que normalmente oxida glucosa como su principal fuente de energía química? El primer punto importante es: aunque las enzimas pueden catalizar una reacción en ambas direcciones, la formación de glucosa no puede iniciarse simplemente invirtiendo las reacciones de la glucólisis. La vía glucolítica contiene tres reacciones termodinámicamente irreversibles (fig. 3-24), y de alguna manera se deben superar estos pasos. Aun si se pudieran invertir todas las reacciones de la glucólisis, sería una manera indeseable de que la célula ejecute sus actividades metabólicas, puesto que no pueden controlarse por separado las dos vías. Así, una célula no puede disminuir la síntesis de glucosa y aumentar su desdoblamiento porque las mismas enzimas estarían activas en ambas direcciones.

Si se comparan las vías para degradar la glucosa (glucólisis) con la vía para sintetizarla (gluconeogénesis), se observa que algunas reacciones son idénticas aunque ocurran en direcciones opuestas, en tanto que otras son muy diferentes (pasos 1 a 3, figura 3-29). Empleando enzimas diferentes para catalizar distintas reacciones clave en dos vías opuestas, la célula puede resolver los problemas termodinámicos y de regulación inherentes a su capacidad para elaborar y degradar a las moléculas mismas.

Podemos ilustrar estos puntos considerando en mayor detalle una de las enzimas clave de ambas reacciones, la glucólisis y la gluconeogénesis. Como se indica en el paso 2 de la figura 3-29, la fosfofructocinasa, una enzima de la glucólisis, cataliza la reacción



que tiene una ΔG° de -3.4 kcal/mol, que la convierte en una reacción prácticamente irreversible. La reacción tiene un $-\Delta G^{\circ}$ tan grande porque está acoplada a la hidrólisis de ATP. En la gluconeogénesis, la formación de fructosa 6-

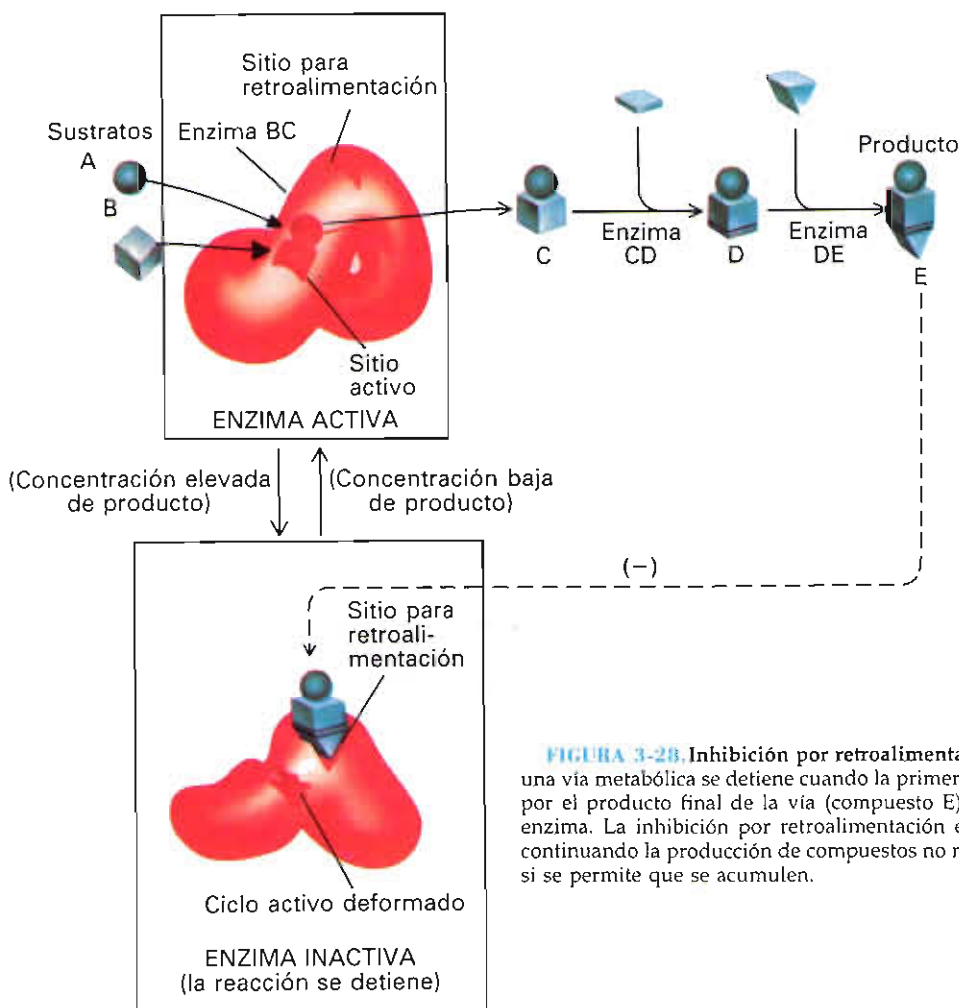
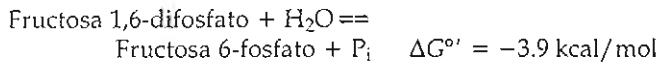


FIGURA 3-28. Inhibición por retroalimentación. El flujo de metabolitos a lo largo de una vía metabólica se detiene cuando la primera enzima de la vía (enzima BC) es inhibida por el producto final de la vía (compuesto E) que se enlaza a un sitio alostérico de la enzima. La inhibición por retroalimentación evita que una célula desperdicie recursos continuando la producción de compuestos no necesarios y que incluso pueden ser tóxicos si se permite que se acumulen.

fosfato es catalizada por la enzima *fructosa 1,6-difosfatasa* mediante la simple hidrólisis



Las enzimas particulares de la glucólisis y la gluconeogénesis descritas antes son enzimas reguladoras clave en sus respectivas vías. Aunque el ATP es un sustrato de la fosfofructocinasa, también es un inhibidor alostérico, en tanto que el ADP y el AMP son activadores alostéricos. Cuando la concentración de ATP se eleva, la actividad de la enzima disminuye de modo que no puede formarse ATP adicional mediante glucólisis. Inversamente, cuando las concentraciones de ADP y AMP se elevan respecto de las de ATP, la actividad de la enzima aumenta para promover la formación adicional de ATP. Por lo contrario, la actividad de la fructuosa 1,6-difosfatasa, una enzima clave de la gluconeogénesis, se regula por modificación covalente. Cuando la concentración de glucosa es alta, la enzima se inhibe por fijación de un grupo fosfato a uno de sus residuos aminoácidos.

Como resultado de este tipo de regulación, la concentración de ATP por lo general no varía, pero permanece alta a pesar de grandes variaciones en la demanda para su consumo. Es importante que la célula mantenga concentraciones altas de ATP en relación con las de ADP y AMP, porque sólo de esa manera la $-\Delta G$ de la hidrólisis de ATP permanece lo bastante grande para efectuar reacciones endergónicas. El descubrimiento y análisis de la modulación alostérica y la modificación covalente reveló que los cambios en el ambiente químico del interior de la célula pueden provocar cambios de conformación y la consecuente actividad de una macromolécula proteínica compleja.

En este capítulo nos concentramos en la conservación de la energía química en forma de ATP y su consumo en el metabolismo. La energía almacenada en el ATP se emplea en gran variedad de procesos (p. ej., figura 3-6). Analizaremos muchos a lo largo de este texto. Aquí subrayaremos que el ATP no siempre se emplea para generar intermediarios fosforilados, como glutamilfosfato en la forma descrita en este capítulo. En algunos casos, el fosfato se transfiere a un residuo aminoácido de una proteína para inducir un cambio de conformación, como ocurre, por ejemplo, durante el movimiento de iones sodio y potasio a través de la membrana plasmática (véase figura 4-42). En otros casos, el ATP se emplea sin formar moléculas fosforiladas; en lugar

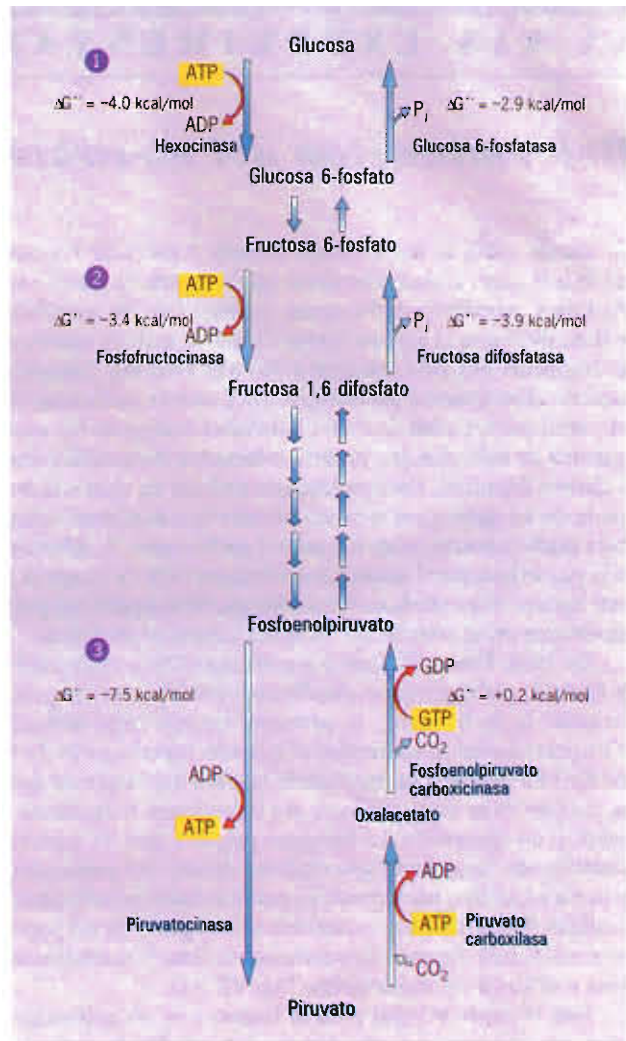


FIGURA 3-29. Glucólisis en comparación con gluconeogénesis.

La mayor parte de las reacciones son las mismas en las dos vías, aunque corren en direcciones opuestas, pero las tres reacciones irreversibles de la glucólisis (pasos 1 al 3) en la vía de la gluconeogénesis son reemplazadas por reacciones diferentes termodinámicamente favorecidas.

de ello, el enlace del ATP (o liberación de ADP y P_i) a un sitio de enlace dentro de una proteína provoca el cambio de conformación requerido (véase figura 9-62).

LA VIA EXPERIMENTAL

Determinación del mecanismo de acción de la lisozima

Un día de 1922, el bacteriólogo escocés Alexander Fleming, quien sufría de catarro, descubrió que una gota de moco nasal añadida a un cultivo de bacterias provoca lisis de las células. Se descubrió que el agente del moco causante de la muerte de las bacterias era una enzima a la cual Fleming denominó lisozima. Los ensayos de Fleming para buscar sustancias con actividad microbiciada no eran casualidad. Luego de ver morir a cientos de soldados por heridas infectadas durante la Primera Guerra Mundial, Fleming decidió dedicar su vida a la búsqueda de un agente microbiciada eficaz y que al mismo tiempo fuera relativamente no tóxico para el ser humano. A diferencia de la penicilina, que Fleming descubrió en 1928, la lisozima no tuvo aplicaciones clínicas. Sin embargo, desempeñó un papel importante en el estudio de los mecanismos enzimáticos.

En 1966, David Phillips y sus colegas, de la Universidad de Oxford, publicaron un detallado modelo de la estructura terciaria de la lisozima, la primera enzima cuya estructura tridimensional se demostró utilizando cristalografía de rayos X.^{1,2} La lisozima se purificó de la clara del huevo de gallina, donde sirve para proteger de infecciones bacterianas al embrión en desarrollo. La lisozima provoca lisis de bacterias hidrolizando los enlaces glucosídicos dentro del polisacárido de la pared celular bacteriana. La pared celular de las bacterias sensibles (bacterias grampositivas) se compone de un copolímero en donde alternan dos aminoazúcares, *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico (fig. VE 3-1).

Este sustrato normal para la lisozima es un polisacárido polimérico de gran tamaño. No es fácil estudiar la enzima en tanto permanezca enlazada a su sustrato normal, de modo que Phillips y sus colegas emprendieron la búsqueda de un inhibidor de bajo peso molecular parecido al sustrato pero que no fuera hidrolizado. Encontraron que la cadena más larga de azúcares que podía ocupar el sitio activo correspondiente a las moléculas de lisozima en su forma cristalina consistía en tres unidades unidas de *N*-acetilglucosamina, a la cual nos referiremos como (NAG)₃. Cuando se prepararon cristales de la

enzima en presencia de (NAG)₃ y luego se sometieron a difracción de rayos X, se observó la molécula (NAG)₃ ocupando una hendidura oval dentro de la enzima llenando casi la mitad de la longitud de la hendidura. También se observó que el trisacárido se enlazaba a la enzima mediante enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. Según datos obtenidos mediante la construcción de modelos del complejo enzima-sustrato, Phillips extrapoló los resultados con (NAG)₃ a moléculas de mayor tamaño y propuso que el sitio activo de la enzima contenía seis subsitios (A a F), cada uno unido a un solo azúcar a lo largo de la cadena del polisacárido. En otras palabras, la hendidura estaría normalmente ocupada por seis unidades adyacentes de azúcar de la pared celular del polisacárido (fig. VE 3-2).

El análisis de la estructura del complejo enzima-(NAG)₃ sugirió un mecanismo para explicar la actividad hidrolítica de la enzima.^{2,3} Cuando se enlazan seis unidades adyacentes de azúcar en la hendidura de la enzima, uno de los azúcares (el cuarto o azúcar D de la figura VE 3-2) no se acomoda con facilidad en el espacio disponible. Para acomodar este azúcar debía forzarse la conformación normal de silla (pág. 43) y aplanarla a una forma aproximada de media silla (fig. VE 3-3). Debido a la tensión física a que está sujeta esta parte del sustrato, y por otras razones, Phillips propuso que el enlace glucosídico que une a los azúcares residentes en los subsitios D y E (azúcares 4 y 5) sería el enlace hidrolizado.

Un examen más detallado de la región de la enzima vecina al enlace glucosídico reveló que los dos residuos aminoácidos se encontraban a una distancia del enlace de unos 0.3 nm a cada lado. Uno de los residuos era ácido aspártico y el otro ácido glutámico, ambos con cadenas laterales que contienen carboxilos. Cuando se consideró el medio de estos dos residuos se esperaba que los estados de ionización de los dos grupos carboxilo eran muy diferentes. El medio del ácido glutámico es no polar, lo cual debía impedir la disociación de su protón, en tanto que el ácido aspártico es polar, lo cual debía

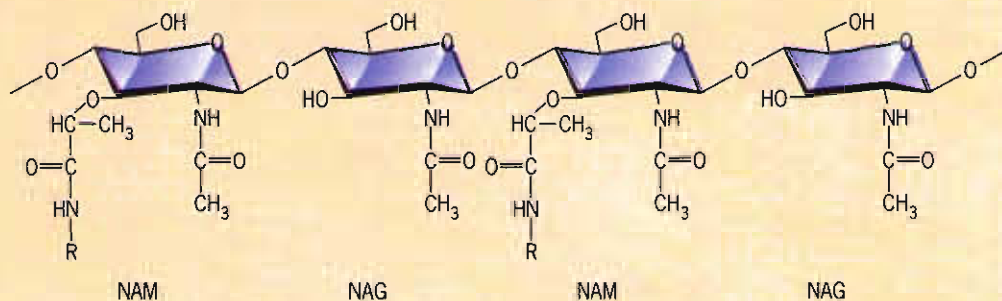


FIGURA VE 3-1. El polisacárido de la pared celular bacteriana, el sustrato de la lisozima, consta de residuos alternados de ácido *N*-acetilmurámico (NAM) y *N*-acetilglucosamina (NAG).

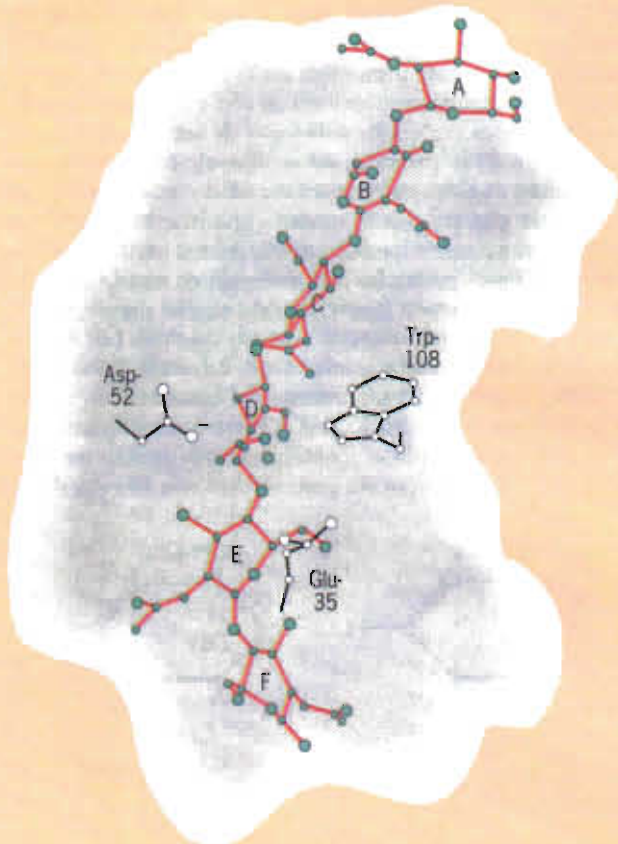


FIGURA VE 3-2. Modelo simplificado de una molécula de lisozima que muestra un hexasacárido enlazado a la grieta de la enzima. Se indica la ubicación de aminoácidos clave en la enzima.

promover la disociación del protón dejando el residuo aspartil con carga negativa. Empleando esta información basada sólo en la estructura de la proteína, Phillips propuso el siguiente mecanismo catalítico (fig. VE 3-3).

En el primer paso del mecanismo de reacción propuesto, la separación del enlace glucosídico se lleva a cabo por interacción del enlace con el ácido glutámico en íntima aposición. Debido a la polaridad del enlace glucosídico, el átomo de oxígeno del sustrato es suficientemente electronegativo para separar al protón desde su grupo carbonilo no disociado del ácido glutámico y provocar hidrólisis ácida del enlace con el sustrato. El rompimiento del enlace por el protón deja al átomo de carbono del sustrato con exceso de carga positiva; un carbono cargado positivamente se denomina *ion carbonio*. La formación del ion carbonio se facilita por la deformación del azúcar luego de su enlace a la enzima. Esta molécula deformada y con carga positiva corresponde a la molécula del sustrato como existe en el estado de *transición* (pág. 88). Se observó que las enzimas actúan estabilizando el estado de transición, y por lo tanto favoreciendo la formación de producto. En el caso de la lisozima, el carbonio con carga positiva se estabiliza por la presencia cercana de un ácido aspártico cargado negativamen-

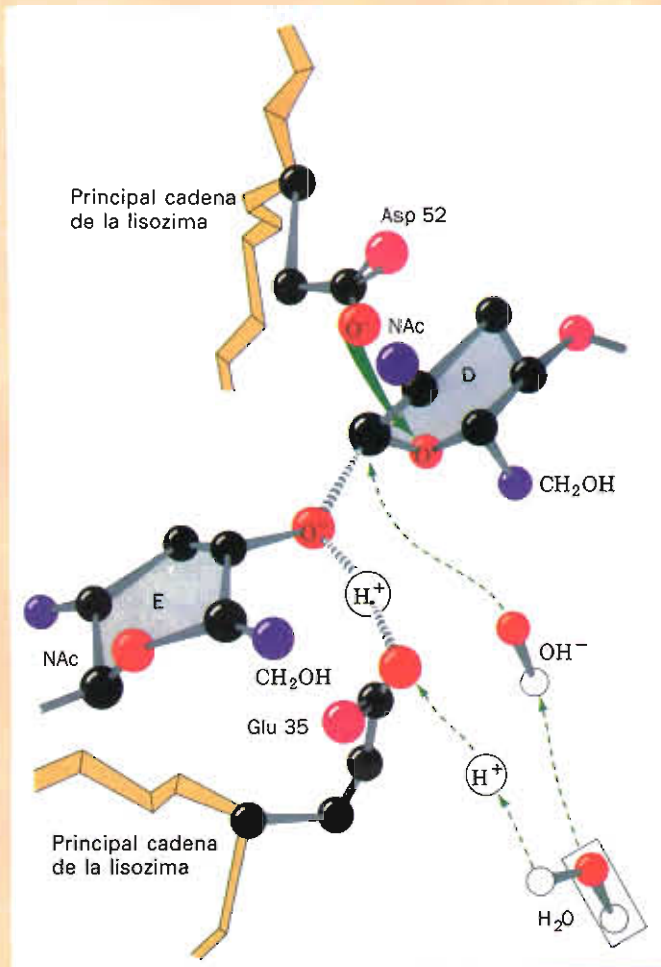


FIGURA VE 3-3. Mecanismo de acción de la lisozima propuesto por Phillips. El enlace entre los azúcares cuarto (D) y quinto (E) del hexasacárido que reside en la hendidura de la molécula de la lisozima se desdobla por hidrólisis ácida utilizando un protón donado por el grupo carboxilo del residuo de ácido glutámico en íntima aposición. La formación del ion carbonio con carga positiva en la posición C1 del azúcar D se facilita por la deformación del azúcar mostrada en la figura y estabilizada por el residuo de ácido aspártico cercano de la enzima. En el paso final el ion carbonio reacciona con un grupo OH⁻ del solvente.

te en la enzima. La reacción del ion carbonio con el ion hidroxilo del solvente concluye la hidrólisis. Como es característico de todo buen modelo, con el mecanismo propuesto para la lisozima se podían hacer muchas predicciones, las cuales pronto fueron sometidas a prueba.

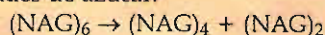
El análisis de la capacidad de la lisozima para atacar sustratos de diferente longitud suministró el primer apoyo para el modelo.⁴ Los oligosacáridos compuestos de dos, tres o cuatro unidades NAG no fueron hidrolizados por la enzima (cuadro VE 3-1). Cuando se le ofreció un sustrato de cinco unidades se observó hidrólisis lenta. Por lo contrario, un oligosacárido de seis unidades (un hexámero) fue hidrolizado por la enzima

CUADRO VE 3-1. Velocidades relativas de hidrólisis para el oligosacárido *N*-acetilglucosamina

Sacárido	Velocidad relativa
(NAG) ₂	0.003
(NAG) ₄	1.0
(NAG) ₃	4 000
(NAG) ₆	30 000

FUENTE: J.A. Rupley y V. Gates, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57:500, 1967.

con eficacia comparable a la hidrólisis de una preparación de polisacáridos de la pared celular. El oligosacárido de seis unidades es lo bastante grande para ocupar el sitio activo. Como se predijo, el hexasacárido fue desdoblado entre el cuarto y el quinto azúcares generando productos que constaban de cuatro y dos unidades de azúcar.

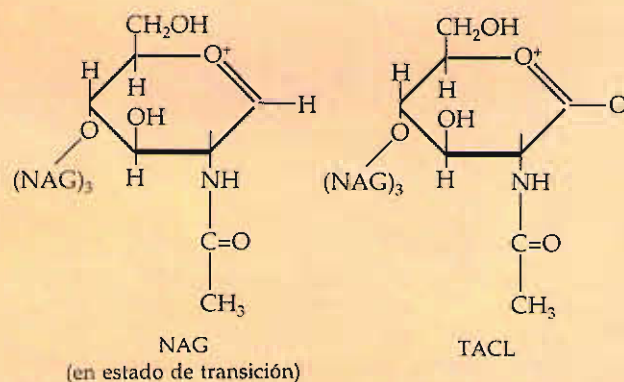


Un aspecto clave del modelo es la incapacidad del sustrato natural para enlazarse a la enzima sin sufrir deformación. Esta última es resultado de la presencia de un voluminoso grupo hidroximetilo ($-\text{CH}_2\text{OH}$) sobre el carbono seis del cuarto azúcar del sustrato (fig. VE 3-3). En caso de eliminar el hidroximetilo, el sustrato debe enlazarse a la enzima con mayor facilidad. Esto es precisamente lo que se observó cuando se incubó la enzima con una versión modificada de (NAG)₄ en la cual el cuarto NAG se alteró suprimiendo el grupo CH_2OH (el cuarto grupo era una *N*-acetilxilosa en vez de una *N*-acetilglucosamina). Según la predicción, este oligosacárido modificado se enlazó a una fuerza 40 a 50 veces mayor que la enzima con (NAG)₄.⁵

Si el modelo de Phillips para la lisozima es correcto y sólo el cuarto de los seis azúcares en el sitio activo está sujeto a tensión física, entonces el enlace de este azúcar a su subsitio en la enzima debe tener propiedades termodinámicas diferentes en comparación con el enlace de otros azúcares. Mediante estudios de cinética en los cuales se enlazaron docenas de diferentes azúcares a la lisozima fue posible medir si la unión de cada azúcar al sustrato en su respectivo subsitio era favorecida ($-\Delta G$) o desfavorecida ($+\Delta G$).⁶ Cuando esto se llevó a cabo se observó que sólo era desfavorecido el enlace del residuo de azúcar al subsitio D ($+2.9$ kcal/mol como mínimo), lo cual, una vez más, apoya el modelo propuesto. La energía requerida para enlazar el cuarto azúcar está más que compensada por la energía liberada cuando los otros azúcares se enlazan a la enzima.

En el modelo de Phillips, la distorsión del cuarto azúcar en el sustrato pone a tensión el enlace glucosídico, lo que ayu-

da en la hidrólisis del enlace. Este azúcar deformado es un elemento importante en la estructura propuesta para el sustrato durante el estado de transición. En 1948, Linus Pauling sugirió que "las enzimas son moléculas con estructura complementaria para los complejos activados de las reacciones que catalizan". En otras palabras, no es el sustrato inicial con el cual la enzima es más complementaria, sino con los estados de transición de alta energía formados conforme los reactantes están listos para convertirse en producto. Si esto es cierto, entonces los inhibidores parecidos a la molécula en estado de transición deben enlazarse a la enzima con mucha mayor fuerza que los inhibidores parecidos al sustrato original. Los inhibidores de este tipo se denominan *análogos del estado de transición* (AET).⁷ En 1972 se probó un análogo del estado de transición para la lisozima denominado TACL (tetra-*N*-acetilquitotetrosa).⁸ El análogo recuerda al (NAG)₄, excepto porque su residuo azúcar terminal se oxida para formar una lactona delta,



que por lo tanto simula la conformación deformada del azúcar D propuesta por Phillips como estructura del estado de transición. El enlace de TACL a lisozima se cuantificó por su capacidad para inhibir la lisis catalizada por la lisozima de un cultivo de células bacterianas sensibles. Cuando se probó a pH cercano al de la enzima óptimamente activa se requirió una concentración 100 veces mayor de (NAG)₄ (un inhibidor que recuerda al sustrato) en comparación con TACL (un inhibidor parecido al estado de transición) para lograr el mismo grado de inhibición de la lisis celular. Estos resultados apoyan la sugerencia de que el sustrato deformado corresponde a un estado de transición. Los cálculos efectuados a partir de los datos indicaron que TACL se enlaza aproximadamente con fuerza 3 600 veces mayor a la enzima que el tetrasacárido no modificado (NAG)₄. Estos investigadores concluyeron que la tensión causada por el enlace al sustrato podía incrementar la velocidad de catálisis por un factor de 10^3 a 10^4 .

Otra predicción hecha por el modelo de Phillips es que dos aminoácidos clave, Asp 52 y Glu 35, deben tener propiedades de ionización muy diferentes debido a diferencias en la

polaridad de su medio. La lisozima muestra actividad óptima a pH 5. A ese pH el modelo propone que el grupo carboxilo de Glu 35 debe permanecer sobre su protón, ya que es el protón donado durante la catálisis ácida. Sin embargo, a este mismo pH, Asp 52 debe tener carga negativa y ser capaz de estabilizar el ion carbonio con carga positiva. La mejor medida del estado de ionización de estos dos grupos carboxilo se logra con una técnica llamada dicroísmo circular, que depende de la absorción de luz polarizada y es muy sensible a cambios en el estado de una proteína. El espectro del dicroísmo circular de la lisozima muestra una fuerte banda de absorción en la longitud de onda de 305 nm, que puede trazarse hasta un residuo de triptófano específico (Trp 108) en la proteína. Trp 108 está muy próximo a Glu 35, el cual a su vez está cercano a Asp 52. Debido a esta proximidad, los cambios en el pH que alteran el estado de ionización de los grupos carboxilo de Glu 35 o Asp 52 tienen efecto sobre el espectro de dicroísmo circular derivado de Trp 108. La comparación de los datos del dicroísmo circular obtenidos con diferentes pH indican que el pK de Glu 35 (pH en el cual la mitad de los grupos están protonados y la otra mitad ionizados) es de 6.1, inusualmente alto (un valor típico sería 4.4).⁹ Por lo contrario, el pK de Asp 52 es de casi 3.4. De conformidad con lo predicho por el modelo, el grupo glutamilcarboxilo retiene su protón a pH 5, en tanto que el aspartilcarboxilo está cargado negativamente.

Otros medios para estudiar aminoácidos clave es modificar selectivamente dichos residuos y medir el efecto sobre la actividad catalítica de la enzima. La modificación química de enzimas nos lleva de inmediato a considerar las técnicas con las cuales han trabajado los químicos orgánicos en los últimos 150 años, justo para modificar cualquier residuo de aminoácidos. Una vez modificado el residuo y cuantificada la actividad de la enzima se puede digerir la enzima en fragmentos y verificar la modificación precisa. La primera publicación de la actividad de una lisozima modificada químicamente se publicó en 1969.¹⁰ Estos investigadores encontraron que cuando trataban la lisozima con un agente (trietiloxoniofluoroborato) que "eliminó" el grupo carboxilo de Asp 52 (convirtiéndolo en un etiléster), la enzima modificada perdía toda actividad catalítica aunque seguía enlazada al sustrato con elevada afinidad. Experimentos subsiguientes en los cuales se modificaron químicamente Asp 52 y Glu 35 confirmaron la expectativa de que ambos residuos deben permanecer en su estado nativo para que la enzima permanezca activa.¹¹ En contraste, si los otros grupos carboxilo de la enzima se esterifican aunque los grupos carboxilo de Asp 52 y Glu 35 no se afecten (lo cual se logra efectuando la esterificación mientras la enzima está unida al sustrato), la enzima retiene su actividad.

Con el desarrollo de nuevas técnicas del DNA es posible hacer deleciones, adiciones o sustituciones a cualquier polipéptido cuyo gen haya sido previamente aislado. Mediante esta técnica, denominada mutagénesis dirigida al sitio (MDS),

se puede alterar específicamente la secuencia de nucleótidos de modo que se reemplaza un aminoácido en el polipéptido por otro aminoácido elegido por el investigador. Cualquier aminoácido de la proteína se puede reemplazar y el investigador puede tener la certeza de que todas las moléculas de proteínas producidas tienen la alteración. El primer uso de MDS en el estudio de la lisozima se publicó en 1989.¹² En este trabajo se estudiaron los papeles de Asp 52 y Glu 35 probando la actividad de proteínas mutantes en las cuales se habían reemplazado estos residuos de aminoácidos. Como era de esperar de los estudios previos, las proteínas mutantes en las cuales se reemplazaron ambos aminoácidos eran catalíticamente inactivas. En un estudio subsecuente se probó la importancia del residuo hidrofóbico en contacto con Glu 35 sustituyendo Trp 108 por un aminoácido polar (una asparagina, pág. 52). La enzima modificada perdió más de 98% de su actividad.¹³ Podemos concluir que el mecanismo de reacción propuesto por Phillips hace 30 años ha resistido la prueba del tiempo de manera notablemente satisfactoria.

BIBLIOGRAFIA

1. Blake, C.C.F. y cols. 1965. Structure of hen egg-white lysozyme. *Nature* 206:757-761.
2. Phillips, D.C. 1966. The three-dimensional structure of an enzyme molecule. *Sci. Am.* 215:78-90 (nov.).
3. Phillips, D.C. 1967. The hen egg-white lysozyme molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57:484-495.
4. Rupley, J.A. y Gates, V. 1967. Studies on the enzymic activity of lysozyme. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 57:496-510.
5. van Eikeren, P. y Chipman, D.M. 1972. Substrate distortion in catalysis by lysozyme. Interaction of lysozyme with oligosaccharides containing N-acetylxylosamine. *J. Am. Chem. Soc.* 94:4788-4790.
6. Chipman, D.M. y Sharon, N. 1969. Mechanism of lysozyme action. *Science* 165:454-464.
7. Wolfenden, R. 1969. Transition state analogues for enzyme catalysis. *Nature* 223:704-705.
8. Semeski, I. y cols. 1972. A transition state analog for lysozyme. *J. Biol. Chem.* 247:4740-4748.
9. Kuramitsu, S. y cols. 1974. Ionization constants of Glu 35 and Asp 52 in hen, turkey and human lysozyme. *J. Biochem.* 76:671-683.
10. Parsons, S.M. y Raferty, M.A. 1969. The identification of aspartic acid residue 52 as being critical to lysozyme activity. *Biochem.* 8:4199-4205.
11. Kuroki, R. y cols. 1986. Chemical mutations of the catalytic carboxyl groups in lysozyme to the corresponding amides. *J. Biol. Chem.* 261:13571-13576.
12. Malcolm, B.A. y cols. 1989. Site-directed mutagenesis of the catalytic residues Asp-52 and Glu-35 of chicken egg white lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:133-137.
13. Inoue, M. 1992. Multiple role of hydrophobicity of Tryptophan-108 in chicken lysozyme. *Biochem.* 31:5545-5553.

SINOPSIS

Energía es la capacidad para hacer trabajo. La energía puede ocurrir en diferentes formas, incluyendo química, mecánica, luminosa, eléctrica y térmica, que pueden convertirse una en otra. Siempre que ocurre intercambio de energía, la cantidad total de energía en el universo permanece constante, pero se pierde energía libre, o sea, energía disponible para efectuar trabajo. La energía utilizable perdida como entropía es resultado de incremento de los movimientos al azar y el desorden del universo. Los organismos vivos son sistemas con poca entropía y se mantienen gracias al ingreso constante de energía externa derivada en último término del sol (p. 78).

Todas las transformaciones energéticas espontáneas (exergónicas) proceden desde un estado de mayor energía libre a un estado de menor energía libre; la ΔG debe ser negativa. En una reacción química, ΔG equivale a la diferencia en el contenido de energía libre entre los reactantes y los productos. Cuanto mayor sea ΔG más alejada se encuentra la reacción de equilibrio. Conforme la reacción procede, ΔG disminuye y llega a cero en equilibrio. Para comparar los cambios de energía que ocurren durante distintas reacciones químicas se determinan las diferencias de energía libre entre reactantes y productos en un conjunto de condiciones estándar denotadas como ΔG° . $\Delta G^\circ = -2.303 RT \log K'_{eq}$; las reacciones con constante de equilibrio mayor que la unidad tienen valores ΔG° negativos. Debe recordarse que ΔG° es un valor fijo que describe la dirección en la cual procede una reacción cuando la mezcla de reacción se encuentra en condiciones estándar. Esta no tiene valor para determinar la dirección de una reacción que ocurre en un momento particular en la célula, gobernada por ΔG y que depende de la concentración de reactantes y productos en ese momento. Las reacciones dentro de las células con valores ΔG° positivos (como la reacción en la cual el fosfato de dihidroxiacetona se convierte en gliceraldehído 3-fosfato) pueden ocurrir en la célula porque la relación entre reactantes y productos se mantiene en un valor mayor que el predicho por K_{eq} (p. 84).

La hidrólisis de ATP es una reacción muy favorecida ($\Delta G^\circ = -7.3$ kcal/mol) y se puede usar para efectuar reacciones que de otro modo no serían favorables. El empleo de la hidrólisis de ATP para efectuar reacciones no favorables se ilustra con la síntesis de glutamina a partir de ácido glutámico y NH_3 ($\Delta G^\circ = +3.4$ kcal/mol). La reacción ocurre por la formación de un intermediario común, fosfato de glutamilo. La hidrólisis de ATP puede participar en procesos como éstos debido a que las células mantienen una elevada proporción $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ bastante arriba del equilibrio, lo que indica que el metabolismo de ordinario opera bajo condiciones de no equilibrio. Esto no significa que cada reacción deba mantenerse en equilibrio. Más bien, ciertas reacciones clave en una vía metabólica ocurren con valores ΔG negativos grandes, que las hace esencialmente irreversibles dentro de la célula y permiten operar toda la vía completa. La concentración de reactantes y productos puede mantenerse en cifras relativamente constantes de no equilibrio (estado estacionario) dentro de la célula debido a que los materiales fluyen en forma continua al interior de la

célula desde el medio externo y los productos de desecho se eliminan continuamente (p. 86).

Las enzimas son proteínas que aceleran mucho la velocidad de reacciones químicas específicas al enlazarse a los reactantes e incrementando la posibilidad de que se conviertan en productos. Como todo verdadero catalizador, las enzimas están presentes en pequeña cantidad, no se alteran de manera irreversible en el curso de la reacción y no tienen efecto sobre la termodinámica de la reacción. Por lo tanto, las enzimas no pueden iniciar reacciones no favorables ($+\Delta G$) para que procedan hacia delante, ni pueden cambiar la proporción entre productos y reactantes en el equilibrio. Como catalizadores, las enzimas sólo pueden acelerar la velocidad de reacciones favorecidas que ocurren en las condiciones de temperatura y pH leves observadas en las células. Las enzimas también se caracterizan por un alto grado de especificidad respecto de sus sustratos, catálisis muy eficaz prácticamente sin efectos indeseables, y la oportunidad de regular su actividad catalítica (p. 88).

Las enzimas actúan al descender la energía de activación (E_A), la energía cinética requerida por los reactantes para someterse a la reacción. Como resultado, un porcentaje mucho mayor de las moléculas reactantes posee la energía necesaria para convertirse en productos en presencia de una enzima. Las enzimas descenden E_A por la formación de un complejo enzima-sustrato. La parte de la enzima que se enlaza al sustrato se denomina sitio activo, que también contiene las cadenas necesarias de aminoácidos, cofactores, o ambos, que influyen en el sustrato de modo que facilite la transformación química. Entre los mecanismos que facilitan la catálisis, las enzimas tienen capacidad para mantener a los reactantes en la orientación apropiada, y también poseen la capacidad de hacer más reactivos a los sustratos al influir en sus características electrónicas y ejercer tensión física que debilita ciertos enlaces dentro del sustrato (p. 89).

Metabolismo es el conjunto de reacciones bioquímicas que ocurren dentro de la célula. Estas reacciones se pueden agrupar en vías metabólicas que contienen una secuencia de reacciones químicas en la cual cada reacción es catalizada por una enzima específica. Las vías metabólicas se dividen en dos tipos muy amplios: vías catabólicas, en las cuales los compuestos se descomponen y se libera energía, y vías anabólicas, que llevan a la síntesis de compuestos más complejos empleando la energía almacenada en las células. Las macromoléculas de diversas estructuras son degradadas por las vías catabólicas a metabolitos pequeños de peso molecular relativamente bajo que constituyen la materia prima para la vía anabólica divergente. Ambos tipos de vías incluyen reacciones de oxidorreducción, en las cuales se transfieren electrones de un sustrato a otro incrementando el estado de reducción del recipiente y el estado de oxidación del donador (p. 96).

El estado de reducción de una molécula orgánica, según puede medirse por el número de hidrógenos por átomo de car-

bono, regularmente suministra una medida del contenido energético de la molécula. Un mol de glucosa completamente oxidada hasta CO_2 y H_2O libera 686 kcal, en tanto que la conversión de un mol de ADP en ATP sólo requiere 7.3 kcal. Por lo tanto, la oxidación de una molécula de glucosa puede producir suficiente energía para generar numerosas moléculas de ATP. La primera etapa del catabolismo de la glucosa es la

glucólisis, en la cual se convierte glucosa a piruvato con una ganancia neta de dos moléculas de ATP y dos moléculas de NADH. Las moléculas de ATP se producen por fosforilación a nivel de sustrato mediante la transferencia de un grupo fosfato del sustrato al ADP. En presencia de O_2 , la mayor parte de las células oxidan NADH mediante una cadena transportadora de electrones, formando ATP por respiración aerobia (p. 100).

PREGUNTAS DE REPASO

1. Describa las diferencias entre la primera y la segunda ley de la termodinámica y explique por qué, cuando se consideran juntas, pueden describir los acontecimientos que ocurren en el universo.
2. ¿De qué manera concuerda la conservación del orden en el estado vivo con la segunda ley de la termodinámica?
3. Describir dos ejemplos en los cuales la entropía de un sistema disminuye y dos ejemplos en los cuales la entropía del sistema aumenta.
4. Analizar las diferencias entre ΔG y ΔG° ; entre ΔG° y $\Delta G'^\circ$; entre la velocidad de reacciones hacia adelante y a la inversa cuando ΔG es negativo, cero o positivo. ¿Cuál es la relación entre $\Delta G'^\circ$ y K'_{eq} ? ¿Cómo puede una célula efectuar una reacción que tiene $+\Delta G'^\circ$?
5. ¿Cómo puede una célula mantener una proporción $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ mayor que uno? ¿Cómo difiere esta relación de la esperada en el equilibrio?
6. ¿Por qué no se puede formar hielo a temperaturas mayores de 0°C ?
7. ¿Cuáles reacciones de glucólisis se acoplan a la hidrólisis del ATP? ¿Cuáles reacciones implican fosforilación a nivel de sustrato? ¿Qué reacciones dependen de fermentación o de respiración aerobia para continuar?
8. ¿Cómo es posible lograr una reacción caracterizada por un ΔG grande y una E_A pequeña? ¿Una E_A grande y una ΔG pequeña?
9. Explicar cómo las enzimas pueden ser tan específicas en relación con el sustrato al cual se unen.
10. Examinar una de las figuras que ilustran los pasos en una reacción catalizada enzimáticamente y describir qué está ocurriendo, sin leer el pie de la figura ni el texto correspondiente.
11. ¿Por qué se describen las vías catabólicas como convergentes, en tanto que las vías anabólicas se describen como divergentes?
12. Comparar la energía obtenida por células que oxidan glucosa de manera anaerobia y de manera aerobia. ¿Cuál es la diferencia en los productos finales de estos dos tipos de metabolismo?
13. Explicar qué significa potencial de transferencia de fosfatos. ¿Cómo se compara el potencial de transferencia de fosfatos del fosfoenolpiruvato contra el de ATP? ¿Qué significa esto termodinámicamente (o sea, en términos de $\Delta G'^\circ$ relativa de hidrólisis)? ¿Qué significa en términos de afinidad para grupos fosfato?
14. ¿Por qué se considera el poder reductor como una forma de energía?
15. Distinguir entre número de recambio y $V_{m\acute{a}x}$.

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. ¿Cómo se espera que un descenso de pH afecte una reacción catalizada por quimotripsina? ¿Por lisozima? ¿Cómo puede un incremento de pH afectar estas dos reacciones?
2. ¿Por qué esperaría usted que la inhibición por retroalimentación en condiciones típicas altere la actividad de la primera enzima de una vía metabólica en vez de una de las últimas enzimas de la vía?
3. Después de revisar las reacciones de la formación de glutamina en la página 85, ¿cuál de las siguientes afirmaciones es cierta en relación con la tercera reacción (o completa)? Explicar por qué su respuesta es verdadera o falsa.
 - a. Si la reacción se escribiera en sentido inverso, su $\Delta G'^\circ$ sería +3.9 kcal/mol.
 - b. Si todos los reactantes y productos se encontraran en condiciones estándar al iniciar el experimento, luego de cierto tiempo la proporción $[\text{NH}_3]/[\text{ADP}]$ disminuiría.
 - c. Conforme la reacción procede, el $\Delta G'^\circ$ se aproxima cada vez más a cero.
 - d. En el equilibrio, las reacciones hacia adelante y a la inversa son iguales y la proporción $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ se convierte en la unidad.
 - e. Es posible formar glutamina en la célula cuando la proporción $[\text{glutamina}]/[\text{ácido glutámico}]$ es mayor que uno.
4. Se acaba de aislar una nueva enzima y tiene determinada velocidad de reacción para tres diferentes concentraciones de sustratos. ¿Estaría usted de acuerdo en que la pendiente de la curva del producto contra el tiempo es igual para las tres concentraciones? ¿Qué podría usted concluir acerca de las condiciones de la mezcla de reacción?
5. Clasifique los siguientes tres compuestos en relación con su potencial para transferir fosfato: ATP, fosfoenolpiruvato, glutamifosfato.
6. En la reacción $\text{R} \rightleftharpoons \text{P}$, si un mol de producto tiene la misma energía libre que un mol de reactante, ¿cuál es el valor de la K_{eq} de esta reacción? ¿Cuál es el valor de $\Delta G'^\circ$?

7. ¿Qué se quiere decir en términos de relaciones de concentración cuando se expresa que la ΔG de la hidrólisis de ATP es aproximadamente -12 kcal/mol, en tanto que la ΔG° es -7.3 kcal/mol?
8. ¿Cuál es la fuente de los dos grupos fosfato en la molécula 1,3-difosfoglicerato, un intermediario metabólico de la glucólisis?
9. Si en la reacción $A \rightleftharpoons B$ se determinó que la K'_{eq} es 10^3 , ¿cuál sería la ΔG° para la reacción? ¿Cuál sería la ΔG° si la K'_{eq} se hubiera determinado que es 10^{-3} ? ¿Cuál es la K'_{eq} de la reacción de hexocinasa indicada en la figura 3-23?
10. La ΔG° de la reacción acetilfosfato + ADP $\rightleftharpoons$ acetato + ATP es -2.8 kcal/mol. Molécula por molécula, el acetilfosfato tiene (mayor, menor, igual) energía libre que el ATP en relación con su compuesto desfosforilado; el ADP tiene (mayor, menor, igual) afinidad para el fosfato en comparación con el acetato). (Encerrar en un círculo las respuestas correctas.)
11. Si la reacción $XA + Y \rightleftharpoons XY + A$ tiene una ΔG° de $+7.3$ kcal/mol, ¿podría ocurrir esta reacción en la célula mediante acoplamiento a hidrólisis de ATP? ¿Por qué sí o por qué no?
12. En una serie de reacciones, $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D$, se determinó que la constante de equilibrio para la segunda reacción ($B \rightarrow C$) es de 0.1. En una célula viva, esperaría usted que la concentración de C sea: 1) igual a B; 2) Un décimo de B; 3) menos de un décimo de B; 4) 10 veces la de B; 5) más de 10 veces la de B? (Encerrar en un círculo todas las respuestas correctas.)
13. La reacción del compuesto X con el compuesto Y para producir el compuesto Z es una reacción no favorecida ($\Delta G^\circ = +5$ kcal/mol). Escribir la reacción química que ocurriría si se utiliza ATP para manejar la reacción.
14. El ATP evolucionó como la molécula central en el metabolismo energético. ¿Podría el 1,3-difosfoglicerato servir para la misma función? ¿Por qué sí o por qué no?
15. Calcular la ΔG para la hidrólisis del ATP en una célula en la cual la proporción $[ATP]/[ADP]$ se ha elevado hasta 100:1, en tanto que la concentración de P_i permanece igual a 10 mM. ¿Cómo se puede comparar la proporción $[ATP]/[ADP]$ cuando la reacción está en equilibrio y la concentración de P_i permanece en 10 mM? ¿Cuál será el valor para ΔG cuando reactivos y productos se encuentren en condiciones estándar (1 M)?

BIBLIOGRAFÍA

Energía

- Atkinson, D.E. 1977. *Cellular Energy and Its Regulation*. Academic Press.
- Harold, F.M. 1986. *The Viral Force: A Study of Bioenergetics*. W.H. Freeman.
- Hill, T.L. 1977. *Free Energy Transduction in Biology*. Academic Press.
- Klotz, I.M. 1986. *Introduction to Biomolecular Energetics*. Academic Press.
- Lehninger, A.L. 1971. *Bioenergetics*. 2a. edición, Benjamin-Cummings.
- Morowitz, H.A. 1981. Entropy anyone? *Hosp. Pract.* 16:114-116.
- Puesner, L. 1974. *Concepts in Bioenergetics*. Prentice-Hall.
- Racker, E. 1976. *A New Look at Mechanisms in Bioenergetics*. Academic Press.

Enzimas y metabolismo

- Boyer, P.D., ed. 1970-present. *The Enzymes*. 3a. edición. Academic Press (vols. 19, 20 on mechanisms of enzyme catalysis, 1990, 1992).
- Clegg, J.S. 1992. Cellular infrastructure and metabolic organization. *Curr. Top. Cell. Regul.* 33:3-14.
- Dressler, D. y Potter, H. 1991. *Discovering Enzymes*. Scientific American Library.
- Dugas, H. y Penney, C. 1981. *Biorganic Chemistry*. Springer-Verlag.
- Entian, K.-D. y Barnett, J.A. 1992. Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Biochem. Sci.* 17:506-510.
- Fersht, A. 1985. *Enzyme Structure and Mechanism*. 2a. edición, W.H. Freeman.
- Kaiser, J. 1994. A new way of seeing proteins in motion. *Science* 265:1525.
- Kaufman, B.T. 1993. Why NADP? *Trends Biochem. Sci.* 18:278.
- Kraut, J. 1988. How do enzymes work? *Science* 242:533-540.
- Krebs, H.A. y Martin, A. 1981. *Reminiscences and Reflections*. Oxford Univ. Press.
- Lipmann, F. 1971. *Wanderings of a Biochemist*. Wiley.

- Lolis, E. y Petsko, G.A. 1990. Transition-state analogues in protein crystallography: Probes of the structural source of enzyme catalysis. *Ann. Rev. Biochem.* 59:597-630.

- Ovadi, J. y Sreere, P.A. 1992. Channel your energies. *Trends Biochem. Sci.* 17:445-447.

- Palmer, T. 1991. *Understanding Enzymes*. 3a. edición, Harwood.

- Petsko, G.A. y cols. 1993. On the origin of enzymatic species. *Trends Biochem. Sci.* 18:372-376.

- Phillips, D.C. 1986. *Protein Structure and Function*. Oxford Univ. Press.

- Phillips, D.C. 1966. The three-dimensional structure of an enzyme molecule. *Sci. Am.* 215:78-80 (nov.).

- Price, N.P. y Stevens, L. 1982. *Fundamentals of Enzymology*. Oxford Univ. Press.

- Reich, E. y cols. 1985. *Proteases and Biological Control*. Cold Spring Harbor Laboratories Press.

- Stroud, R.M. 1974. A family of protein cutting enzymes. *Sci. Am.* 231:74-88 (julio).

- Suckling, C.J. editor, 1984. *Enzyme Chemistry*. Chapman & Hall.

- Taubes, G. 1994. X-ray movies start to capture enzyme molecules in action. *Science* 266:364-365.

- Walsh, C. 1979. *Enzymatic Reaction Mechanisms*. W.H. Freeman.

- Wells, J.A. y Estell, D.A. 1988. Subtilisin-An enzyme designed to be engineered. *Trends Biochem. Sci.* 13:291-297.

- Williams, R.J.P. 1993. Are enzymes mechanical devices? *Trends Biochem. Sci.* 18:115-117.

Resistencia a los antibióticos

- Caldwell, M. 1994. Prokariotes at the gate. *Discover* 15:45-50.

- Davies, J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264:375-382.

- Spratt, B.G. 1994. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 264:388-393.

Estructura y función de la membrana plasmática

- 4-1 Resumen de las funciones de la membrana
- 4-2 Conceptos generales de la estructura de la membrana plasmática
- 4-3 Lípidos y fluidez de la membrana
- 4-4 Naturaleza dinámica de la membrana plasmática

- 4-5 Movimiento de sustancias a través de membranas celulares

La perspectiva humana: Fibrosis quística: importancia clínica del transporte de membrana

- 4-6 Potenciales de membrana e impulsos nerviosos

La vía experimental: El receptor para acetilcolina

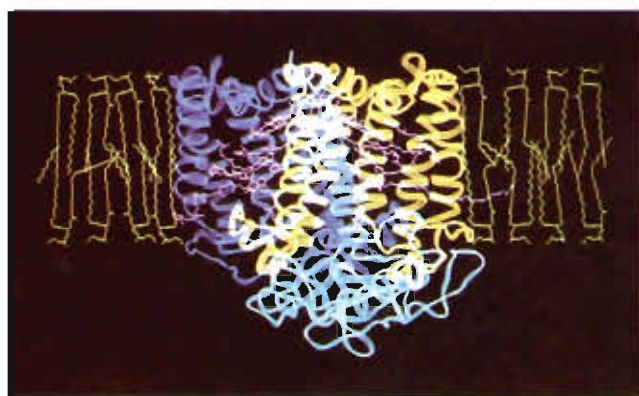


FIGURA 4-1 Disposición tridimensional de los polipéptidos que constituyen el centro de reacción fotosintética residente en la membrana plasmática de una bacteria. Se muestran en amarillo, azul y verde los diferentes polipéptidos situados en el centro de reacción. (Tomado de G. Feher, J.P. Allen, M.Y. Okamura y D.C. Rees. Reimpreso, con permiso, de Nature 339:113, 1989. Copyright 1989, Macmillan Magazines Limited.)

Las paredes externas de una casa o de un automóvil constituyen una barrera fuerte y rígida que protege a los habitantes de un mundo externo impredecible y áspero. Se podría esperar que el límite exterior de una célula viviente consistiera igualmente de una barrera dura e impenetrable, puesto que también debe proteger al delicado contenido interno contra los rigores de un inhóspito mundo no viviente. Aun así, las células están separadas del ambiente externo por una estructura denominada **membrana plasmática**, que sólo tiene unas cuantas moléculas de espesor (5 a 10 nm). Se necesitarían 1 000 membranas plasmáticas apiladas una sobre otra para igualar el espesor de una sola página de este libro.

Debido a su delgadez, cuando se examina un corte de la célula con microscopio de luz no se descubre signo alguno de la membrana plasmática. En realidad, no fue sino hasta finales del decenio de 1950 que las técnicas para preparar y teñir tejidos habían progresado hasta el punto que permitieron observar con claridad la membrana plasmática mediante microscopio electrónico. Las primeras micrografías electrónicas, como las logradas por J.D. Robertson, de la Universidad Duke, mostraron la membrana plasmática como una estructura de tres capas compuesta por dos capas de color oscuro orientadas hacia afuera y en medio una capa de color claro (fig. 4-1, a). Todas las membranas que se examinaron con detalle, ya fueran plasmáticas, nucleares o citoplásmicas (fig. 4-1, b), o las tomadas de plantas, animales o microorganismos, mostraron esta misma ultraestructura. Además de suministrar una imagen visible de esta importante y vital estructura celular, esas micrografías electrónicas generaron un acalorado debate respecto de la composición molecular de las diferentes capas de una membra-

na, discusión que llegó al punto medular del tema referente a la estructura y función de la membrana. Más adelante retornaremos a la estructura de la membrana, pero primero examinaremos algunas de las principales funciones de la membrana en una célula viva (fig. 4-2).

4-1 Resumen de las funciones de la membrana

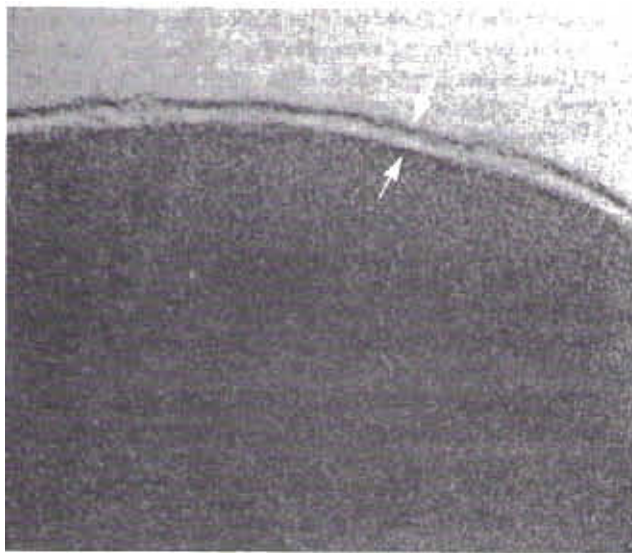
1. Compartimentalización. Las membranas son hojas continuas, sin aberturas, como las que encierran los compartimientos intracelulares. La membrana plasmática rodea todo el contenido de la célula, en tanto que las membranas nuclear y citoplásmica incluyen varios espacios celulares internos en los cuales tienen lugar actividades especializadas. Igual que el espacio dentro de un edificio debe dividirse para tener actividades de diferente tipo en sus compartimientos con un mínimo de interferencia externa, así también debe dividirse la célula. En la célula, la compartimentalización es particularmente importante debido a que los diferentes espacios están llenos de líquido, y si estos líquidos se mezclaran sería desastroso.

2. Las membranas constituyen barreras selectivamente permeables. Las membranas impiden el libre intercam-

bio de materiales de un lado a otro, pero al mismo tiempo proporcionan el medio para comunicar un espacio con otro. La membrana plasmática debe garantizar que las sustancias apropiadas penetren al citoplasma desde el espacio externo y las sustancias inapropiadas salgan de la célula. En esta función, la membrana plasmática actúa como barrera selectivamente permeable.

3. Transporte de solutos. La membrana plasmática contiene los mecanismos para transportar físicamente sustancias de un lado al otro de la membrana, con frecuencia de una región donde un soluto se encuentra en baja concentración a otra donde dicho soluto muestra concentración más alta. Los mecanismos de transporte de la membrana permiten que la célula acumule azúcares y aminoácidos, necesarios como energéticos de su metabolismo y para construir sus macromoléculas. La membrana plasmática tiene otra función relacionada con el transporte de solutos, que consiste en separar iones con carga opuesta y establecer gradientes iónicos. Esta capacidad es crucial para las células nerviosas y musculares, pero también puede desempeñar un papel en la respuesta de cualquier célula a su ambiente.

4. Respuesta a señales externas. La membrana plasmática tiene una función muy importante en la respuesta de una célula a los estímulos externos, proceso conocido como **transducción de señales**. Las membranas poseen re-



(a)

50 nm

FIGURA 4-1. Aspecto trilaminar de las membranas. *a)* Micrografía electrónica que muestra la estructura en tres capas (trilaminar) de la membrana plasmática de un eritrocito. Las flechas indican los bordes interno y externo. *b)* Borde externo de una célula muscular diferenciada desarrollada en un cultivo que muestra la estructura trilaminar similar a la de la membrana plasmática (MP) y la membrana del retículo endoplásmico liso (REL). (*a)*: Cortesía de J.D. Robertson; *b)*: según Andrew R. Marks y cols. *J. Cell Biol.* 114:307, 1991; con autorización de Rockefeller University Press.)



(b)

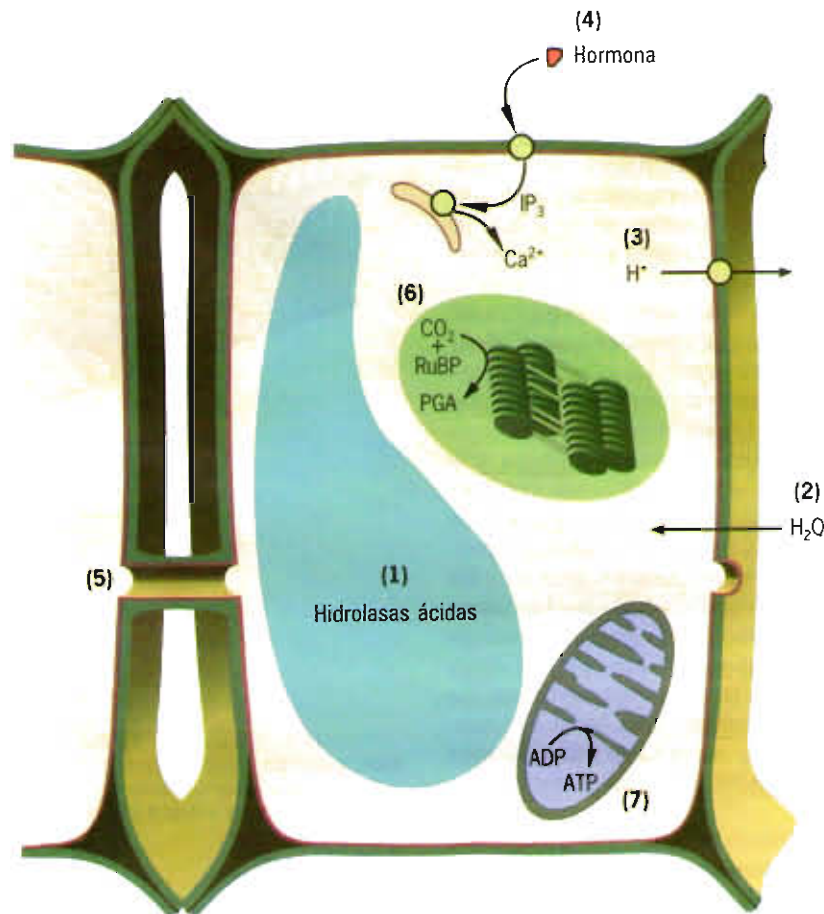


FIGURA 4-2. Resumen de las funciones de la membrana en una célula vegetal. 1) Ejemplo de una membrana compartimentalizada en la cual las enzimas hidrolíticas (hidrolasas ácidas) quedan encerradas dentro de una vacuola rodeada por una membrana. 2) Ejemplo del papel de las membranas como barrera selectivamente permeable. Las moléculas de agua pueden penetrar rápidamente a través de la membrana plasmática llenando el espacio disponible dentro de la célula vegetal y ejerciendo presión contra su pared celular. 3) Ejemplo de transporte de soluto. Los iones hidrógeno producidos por varios procesos metabólicos en el citoplasma son bombeados fuera de las células vegetales hacia el espacio extracelular por una proteína de transporte localizada en la membrana plasmática. 4) Ejemplo de la participación de una membrana en la transferencia de información de un lado a otro (transducción de señales). En este caso, una hormona (p. ej., ácido abscísico) se enlaza a la superficie externa de la membrana plasmática y desencadena la liberación de un mensaje químico (como IP_3) dentro del citoplasma. En este caso, IP_3 provoca la liberación de Ca^{2+} de un almacén citoplásmico. 5) Ejemplo del papel de la membrana en la comunicación de célula a célula. Los orificios entre células vegetales adyacentes, denominados plasmodesmata, permiten que los materiales se desplacen directamente del citoplasma de una célula a sus vecinas. 6) Ejemplo del papel de las membranas citoplásmicas como sitio de localización de enzimas. La fijación de CO_2 por la célula vegetal es catalizada por una enzima que se relaciona con la superficie exterior de las membranas tilacoides del cloroplasto. 7) Ejemplo del papel de las membranas en la transducción de energía. La conversión de ADP a ATP ocurre en íntima conexión con la membrana externa de la mitocondria.

ceptores que se combinan con moléculas específicas (**ligandos**) con estructura complementaria. Diferentes tipos de células tienen membranas con distintos tipos de receptores, y por lo tanto pueden reconocer y responder a diferentes ligandos de su ambiente. Los ligandos mejor estudiados son hormonas, factores de crecimiento y neurotransmisores, todos unidos a la membrana plasmática pero que no la atraviesan. La interacción de un receptor de membrana plasmática con un ligando externo a veces provoca que la membrana genere una nueva señal que estimula o inhibe actividades internas. Por ejemplo, las señales generadas en la membrana plasmática pueden indicar a la célula que elabore más glucógeno, se prepare para la división celular, se

desplace hacia los puntos de mayor concentración de un compuesto particular, libere calcio de sus reservas internas o posiblemente que se suicide.

5. Interacción intercelular. Situada en la frontera de la célula viviente, la membrana plasmática media las interacciones que ocurren entre las células de un organismo multicelular. La membrana también permite a las células reconocerse entre sí, adherirse cuando es apropiado e intercambiar materiales e información.

6. Sitios para actividades bioquímicas. Las membranas proporcionan un medio para organizar las actividades celulares. Puesto que los reactantes se encuentran en solución, sus posiciones no son estables y su interacción depen-

de de colisiones al azar. En la página 61 del capítulo 2 se hizo notar que la unión de enzimas en complejos multienzimáticos facilita mucho la secuencia de una reacción, debido a que cada enzima se sitúa en el lugar correcto en el momento adecuado. De igual manera, las membranas suministran a la célula una extensa armazón o andamiaje dentro del cual se pueden ordenar los componentes para una interacción eficaz. Una parte significativa de los mecanismos enzimáticos de una célula se relaciona con sus diferentes membranas.

7. Transducción de energía. Las membranas participan estrechamente en los procesos que convierten un tipo de energía en otro (*transducción de energía*). La más fundamental transducción de energía ocurre durante la fotosíntesis, cuando los pigmentos unidos a la membrana absorben energía de la luz solar, la convierten en energía química y la almacenan en carbohidratos. Las membranas también participan en la transferencia de energía química de grasas y carbohidratos al ATP. En eucariotes, los mecanismos para estas conversiones energéticas se encuentran dentro de las membranas de los cloroplastos y las mitocondrias. Las membranas también sirven como sitios para almacenar energía cuando mantienen concentraciones diferentes de iones específicos o de otros solutos a través de su superficie. La energía almacenada en estos gradientes es igual a la acumulada en una pila eléctrica y se emplea para ejecutar muchas de las actividades más importantes de la célula.

Este capítulo se refiere principalmente a la estructura y funciones de la membrana plasmática, con excepción de su papel mediador en las interacciones intercelulares, que analizaremos en el capítulo 7. La estructura y funciones de las membranas citoplásmicas se estudian en el capítulo 8.

1-2 Conceptos generales de la estructura de la membrana plasmática

Desde hace más de 50 años se sabe que la membrana está compuesta principalmente por lípidos y proteínas. El verdadero núcleo de la membrana consiste en una vaina de fosfolípidos dispuestos en una capa bimolecular, una **bicapa de lípidos** (fig. 4-3). Las bicapas de lípidos sirven principalmente como armazón estructural para la membrana y como barrera que impide movimientos desordenados de materiales hidrosolubles hacia adentro y afuera de la célula. Las proteínas de la membrana, por otra parte, efectúan la mayor parte de las funciones específicas resumidas en la sección previa.

Los primeros modelos de la estructura de la membrana, en particular el propuesto en 1935 por Hugh Davson, del University College de Londres, y por James Danielli, de la Universidad de Princeton, propusieron que las proteínas de la membrana se encontraban en la superficie externa de la bicapa de lípidos. Los experimentos efectuados a fines del decenio de 1960 condujeron a un concepto radicalmente diferente de la estructura de la membrana, según se detalló en el *modelo de mosaico fluido* propuesto, en 1972, por S. Jonathan Singer y Garth Nicolson, de la Universidad de California. En el modelo de mosaico fluido, el “dogma cen-

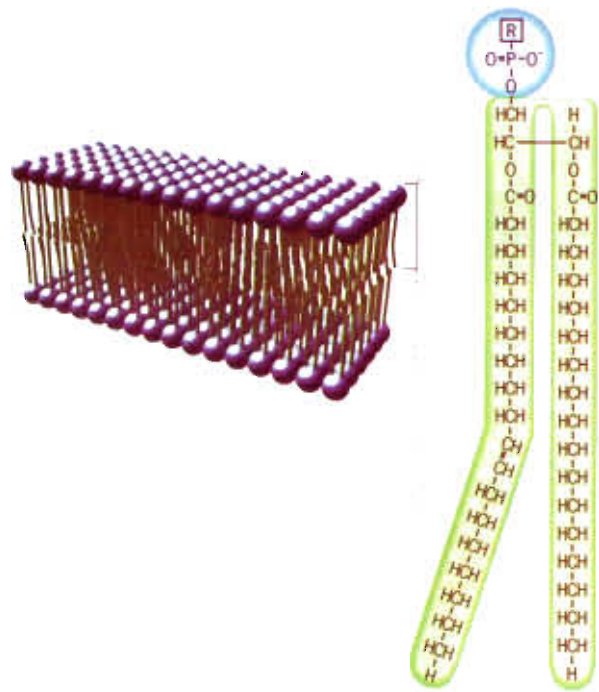


FIGURA 4-3. Bicapa de lípidos. El centro de una membrana contiene una capa bimolecular de fosfolípidos orientada con sus grupos hidrosolubles hacia el frente de la superficie externa y sus colas de ácidos grasos hidrófobos hacia el interior.

tral” de la biología de la membrana durante más de dos decenios, la bicapa de lípidos se retiene como núcleo de la membrana, pero se presta gran atención al estado físico de los lípidos (fig. 4-4). En vez de consistir en una bicapa inmóvil estática, las moléculas de lípidos se presentan en estado líquido capaces de girar y efectuar desplazamientos laterales dentro de la membrana.

La estructura y disposición de las proteínas de la membrana en el modelo de mosaico fluido son notablemente diferentes de las propuestas en modelos previos. Las proteínas del mosaico fluido se presentan como “un mosaico” de partículas discontinuas que penetran profundamente hacia el interior y atraviesan por completo la capa de lípidos (fig. 4-4). Pero lo más importante del modelo de mosaico fluido es que considera las membranas celulares como estructuras dinámicas cuyos componentes son móviles, con capacidad para reunirse y participar en interacciones transitorias o semipermanentes de diferentes tipos. En las siguientes secciones examinaremos parte de las pruebas empleadas para formular y apoyar este modelo dinámico de la estructura de la membrana y consideraremos algunos datos recientes que aún confirman este modelo.

Composición de la membrana

Todas las membranas son estructuras de lípidos y proteínas cuyos componentes se mantienen unidos formando una delgada capa por medio de enlaces no covalentes. Además

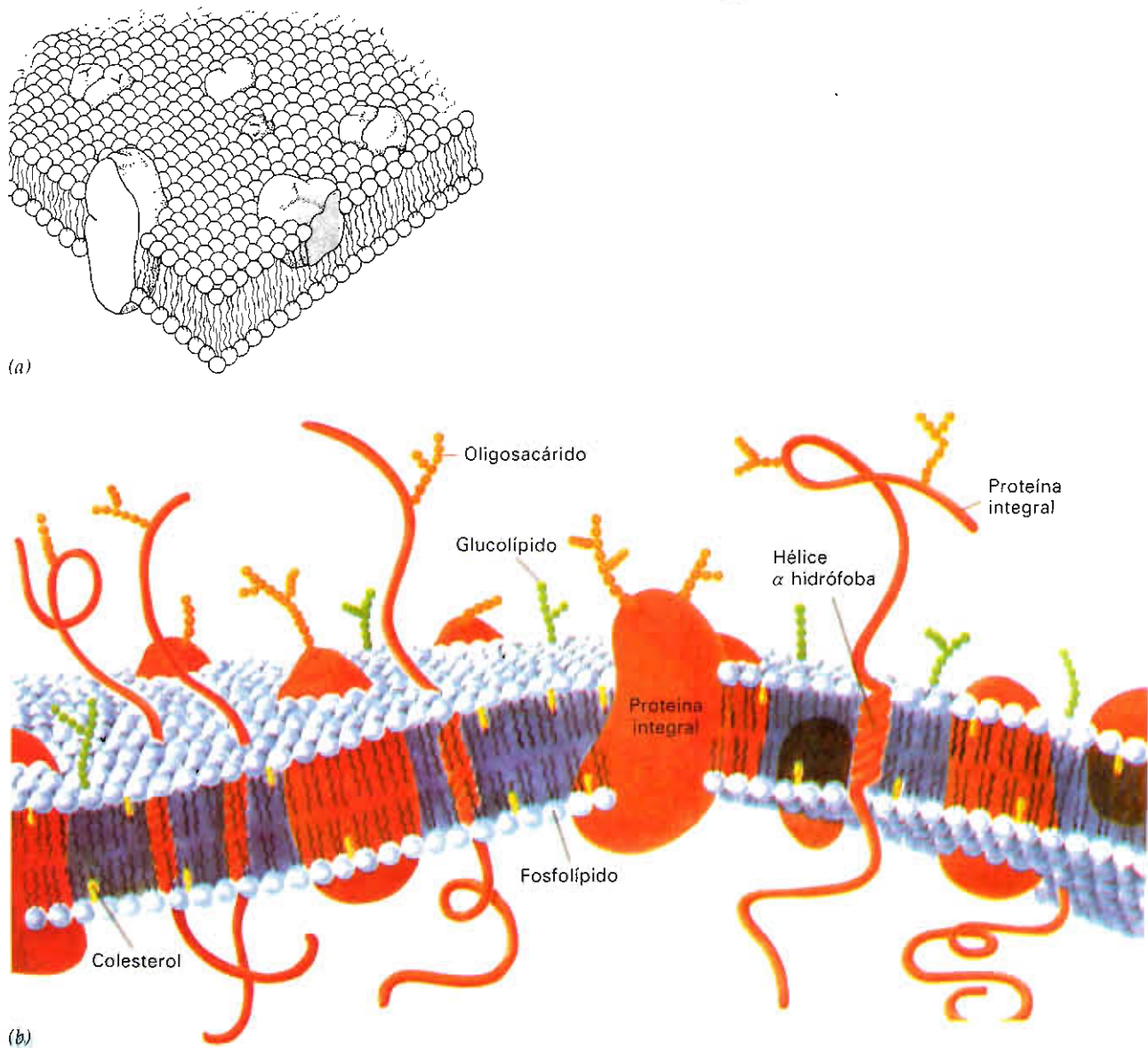


FIGURA 4-1. Estructura de la membrana plasmática. *a)* Modelo del mosaico fluido de la estructura de la membrana según lo propusieron inicialmente Singer y Nicolson, en 1972. A diferencia de modelos previos, las proteínas penetran y atraviesan la bicapa de lípidos. *b)* Representación actual de la membrana que muestra la misma organización básica propuesta por Singer y Nicolson. Ahora se sabe que la superficie externa de la mayor parte de las proteínas de la membrana, y también un pequeño porcentaje de los fosfolípidos, contienen cadenas cortas de azúcares (cadenas con cuentas amarillas y verdes) que constituyen glucoproteínas y glucolípidos. Estas porciones de las cadenas de polipéptidos se extienden a través de todo el espesor de la bicapa de lípidos; en condiciones típicas se presentan como hélices alfa compuestas de aminoácidos hidrófobos. (*a*: Reimpreso con permiso de S.J. Singer y G.L. Nicolson, *Science* 175:720, 1972. *American Association for Advancement of Science*.)

de lípidos y proteínas, la membrana también contiene carbohidratos (fig. 4-4, *b*). La proporción entre lípidos y proteínas varía considerablemente (cuadro 4-1) según el tipo de membrana celular (plasmática, reticuloendoplásmica, complejo Golgi), tipo de organismo (procariote, vegetal, animal) y tipo de célula (cartilaginosa, muscular, hepática). Por ejemplo, en la membrana interna de las mitocondrias, la relación proteína/lípidos es muy alta en comparación con la membrana plasmática del eritrocito, que a su vez es alta comparada con las membranas de la vaina de mielina

que rodean una célula nerviosa. Estas diferencias pueden correlacionarse en gran medida con la función particular de estas membranas. La membrana interna de las mitocondrias contiene proteínas transportadoras de la cadena de transporte de electrones y su contenido de lípidos es menor en relación con otras membranas. La mejor manera de describir la vaina de mielina es como un aislante eléctrico que envuelve la neurona (fig. 4-5), una función que es mejor realizada por una gruesa capa de lípidos de resistencia eléctrica elevada y contenido mínimo de proteínas.

CUADRO 4-1. Contenido de lípidos y proteínas de las membranas

Membrana	Proteína/lípidos (peso/peso)	Colesterol/lípidos polares (mol/mol)	Principales lípidos polares*
Mielina	0.25	0.7-1.2	Cer, PE, PC
Membranas plasmáticas			
Célula hepática	1.0-1.4	0.3-0.5	PC, PE, PS, Efm
Ascitis de Ehrlich	2.2		
Vellosidad intestinal	4.6	0.5-1.2	
Fastasma de eritrocito	1.5-4.0	0.9-1.0	Efm, PE, PC, PS
Reticulo endoplásmico	0.7-1.2	0.03-0.08	PC, PE, Efm
Mitocondrias			DPG, PC, PE, Plas
Membrana externa	1.2	0.03-0.09	
Membrana interna	3.6	0.02-0.04	
Bastoncillos de la retina	1.5	0.13	PC, PE, PS
Laminillas del cloroplasto	0.8	0	GalDG, SL, PS
Bacterias			
Grampositivas	2.0-4.0	0	DPC, PG, , PE, aaPG
Gramnegativas		0	PE, PG, DPG, AP
Micoplasma	2.3	0	
Halófila	1.8	0	PGP análogo del éter

* Las abreviaturas son: Cer, cerebrosidos; DPG, difosfatidilglicerol; GalDG, galactosildiglicérido; AP, ácido fosfatídico; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; aaPG, ésteres aminoácil de fosfatidilglicerol; Plas, plasmalógeno; SL, sulfolípido; Efm, esfingomielina.

FUENTE: E.D. Korn, *Reproducido, con permiso, de ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY*, vol. 38, © 1969, por Annual Reviews Inc.

Lípidos de la membrana

Las membranas contienen varios tipos de lípidos, todos **anfipáticos**; o sea, contienen regiones hidrófilas e hidrófobas (como se ilustra en la figura 4-3). La mayor parte de los lípidos de la membrana contienen un grupo fosfato, y las principales excepciones son colesterol y glucolípidos. Puesto que casi todos los fosfolípidos de la membrana poseen un esqueleto glicerol, se les denomina **fosfoglicéridos** (fig. 4-6). A diferencia de los triglicéridos, que poseen tres ácidos grasos (pág. 47, cap. 2), los glicéridos de la membrana son **diglicéridos**: sólo dos grupos hidroxilo del glicerol se esterifican para formar ácidos grasos; el tercero se esterifica para formar un grupo fosfato. La molécula sin otras sustituciones, además del fosfato y las dos cadenas lípidas acilo, se denomina **ácido fosfatídico** y prácticamente está ausente en la membrana. En vez de esto, los diglicéridos de la membrana contienen un grupo adicional unido al fosfato, por lo general en forma de colina (para formar la fosfatidilcolina), etanolamina (la fosfatidiletanolamina), serina (la fosfatidilserina), o inositol (el fosfatidilinositol). Cada uno de estos grupos es pequeño e hidrófilo y, junto con el fosfato eléctricamente cargado al cual se unen, forman un dominio muy hidrosoluble en un extremo de la molécula denominado **grupo de la cabeza**. Por lo contrario, las cadenas lípidas acilo son largas, no ramificadas, formadas por hidrocarburos hidrófobos (fig. 4-6). Un ácido graso de la membrana puede estar completamente saturado (o sea, carecer de dobles enlaces), monoinsaturado (un solo doble enlace) o poliinsaturado (más de un doble enlace). A menudo los fosfoglicéridos contienen una cadena lípida acilo insaturada y una saturada.

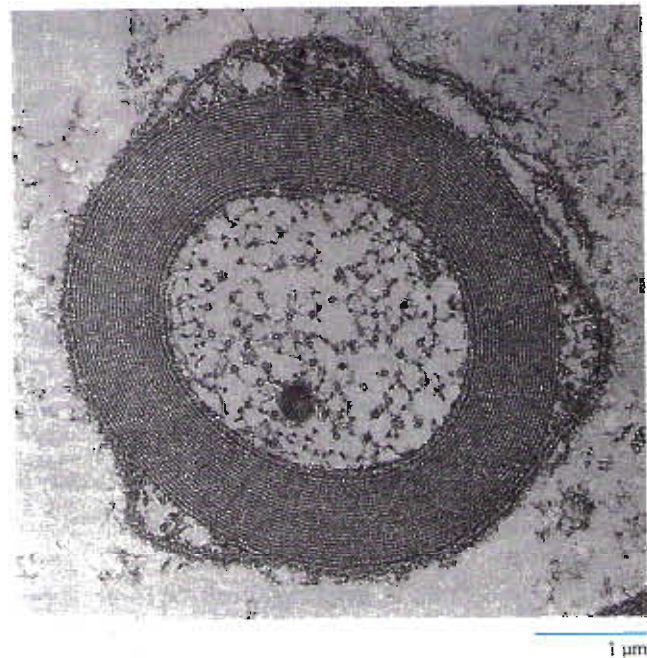


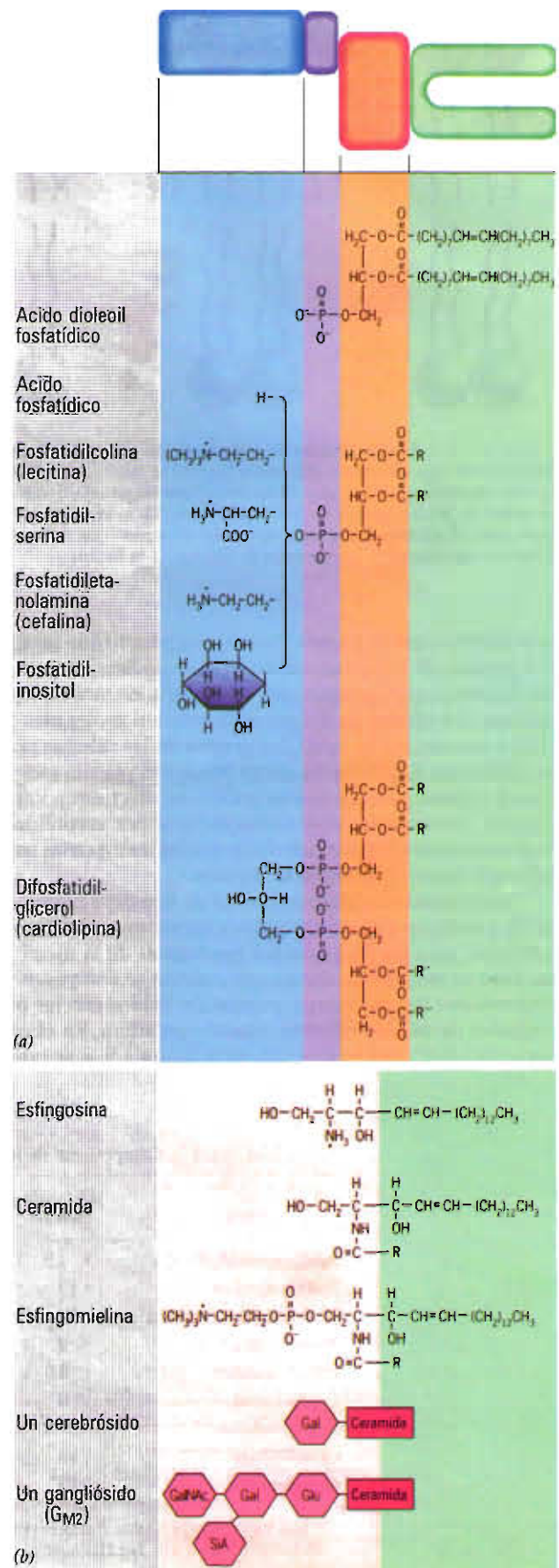
FIGURA 4-5. Vaina de mielina. Micrografía electrónica del axón de una célula nerviosa rodeada por una vaina de mielina que consta de capas concéntricas de membrana plasmática. La vaina de mielina aísla la célula nerviosa de su entorno y como resultado aumenta la velocidad a la cual pueden viajar los impulsos a lo largo del axón (analizado en la página 156). (Tomado de Leonard Napolitano, Francis LeBaron y Joseph Scaletti, *J. Cell Biol.* 34:820, 1967. Con permiso de Rockefeller University Press.)

FIGURA 4-6. Estructura química de los lípidos de la membrana. *a)* Estructura de los lípidos derivados de glicerol, todos los cuales son fosfolípidos (véase también figura 2-22). *b)* Lípidos derivados de esfingosina. La esfingomielina es un fosfolípido, los gangliósidos son glucolípidos. Un tercer lípido de la membrana es el colesterol, que se muestra en la siguiente figura (R = cadena lipoacil).

Un tipo menos abundante de lípidos de membrana, denominados *esfingolípidos*, se derivan de esfingosina, un alcohol aminado que contiene una larga cadena de hidrocarburo (fig. 4-6). Los esfingolípidos contienen esfingosina unida a un ácido graso (R en la figura 4-6, *b*) a través de su grupo amino. Esta molécula es un *ceramido*. Los diferentes lípidos formados por esfingosina contienen grupos adicionales esterificados en el alcohol terminal de la fracción esfingosina. Si el resultado de la sustitución es la introducción de un grupo fosforilcolina, entonces la molécula es una esfingomielina, el otro *fosfolípido* de la membrana. La molécula será un *glucolípido* si la sustitución introduce un carbohidrato. Si el carbohidrato es un azúcar simple, el glucolípido se denomina *cerebrósido*; si es un oligosacárido, el glucolípido se llama *gangliósido*. Puesto que todos los esfingolípidos tienen dos largas cadenas de hidrocarburos hidrófobas en un extremo y una región hidrófila en el otro, también son anfipáticos y con estructura total básicamente similar a la de fosfoglicéridos.

Otro componente lípido de ciertas membranas es el esteroide *colesterol* (véase fig. 2-9), que en ciertas células animales puede constituir hasta 50% de las moléculas lípidas de la membrana plasmática. Las membranas plasmáticas de la mayor parte de las células vegetales y de todas las células bacterianas carecen de colesterol. El *colesterol* es más pequeño que los otros lípidos de la membrana y menos anfipático. Como se muestra en la figura 4-7, las moléculas de colesterol se orientan con sus grupos hidroxilo hidrófobos hacia la superficie de la membrana y su extremo hidrófobo integró a la bicapa de lípidos. Más adelante analizaremos el efecto de estas moléculas sobre las propiedades de la bicapa. En el cuadro 4-2 se presentan los lípidos que componen diferentes membranas.

Bicapa de lípidos. En 1925, dos científicos holandeses, E. Gorter y F. Grendel, propusieron por primera vez que las membranas celulares podían contener una bicapa de lípidos. Estos investigadores extrajeron lípidos de eritrocitos humanos y midieron la superficie cubierta por dichos lípidos al extenderlos sobre la superficie del agua (fig. 4-8, *a*). Puesto que los eritrocitos de mamífero carecen de núcleo y de organelos citoplásmicos, la membrana plasmática es la única estructura que contiene lípidos; por lo tanto, se puede asumir que todos los lípidos del eritrocito corresponden a la membrana plasmática (página 140). La proporción entre la superficie de agua cubierta por los lípidos extraídos de eritrocitos y la superficie calculada para los eritrocitos de los cuales se extrajeron dichos lípidos varió entre 1.8 y 2.2 a 1. Gorter y Grendel concluyeron que la verdadera proporción era 2:1 y que la membrana plasmática contenía una capa bimolecular de lípidos o simplemente una *bicapa de lípidos*. También sugirieron que los grupos polares de cada capa molecular (*hoja*) se dirigen al exterior de la bicapa (como se muestra en la figura 4-8, *b*). Esta sería la dispo-



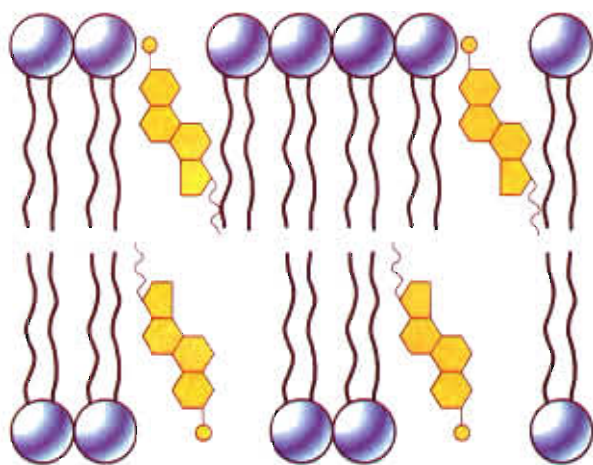


FIGURA 4-7. Las moléculas de colesterol de una membrana se orientan con sus extremos hidrófilos pequeños hacia la superficie externa de la bicapa y la masa de su estructura empaquetada dentro de las colas de ácidos grasos de los fosfolípidos. La colocación de las moléculas de colesterol impide el apretado empaquetamiento de los fosfolípidos, que tiende a incrementar la fluidez de la bicapa.

sición termodinámicamente favorecida, puesto que los grupos polares de la cabeza de los lípidos podían interactuar con las moléculas de agua que los rodean, en tanto que las cadenas hidrófobas de lípidos acilo estarían protegidas del medio acuoso. Por lo tanto, los grupos de las cabezas polares enfrentan al citoplasma en un borde y el plasma sanguíneo en el otro. Aunque Gorter y Grendel efectuaron varios cálculos erróneos (compensados entre sí por casualidad), llegaron a la conclusión correcta de que las membranas naturales contienen una bicapa de lípidos.

La presencia en las membranas de una capa bimolecular de moléculas lípidas anfipáticas tiene consecuencias importantes para las propiedades fisiológicas de la membrana. Esto se manifiesta claramente cuando se comparan las propiedades de una bicapa *artificial* de lípidos con las propiedades de una membrana celular verdadera. En el aparato cuyo diagrama se muestra en la figura 4-9, *a*, se puede

preparar con facilidad una bicapa artificial. Los lípidos empleados se recogen con la punta de un pincel fino y luego se aplican en los pequeños agujeros de una hoja de plástico que separa dos cámaras acuosas. Los lípidos colocados a través de las aberturas forman una delgada película que *espontáneamente* se adelgaza hasta un espesor menor de 10 nm (fig. 4-9, *b*). Muchos criterios demuestran que esta película es una bicapa de lípidos con la misma organización mostrada en la figura 4-3. La formación espontánea de una bicapa indica que esta disposición de las moléculas lípidas es la organización termodinámicamente preferida.

Las bicapas artificiales también pueden adoptar la forma de vesículas esféricas llamadas **liposomas**; según el método de formación, pueden consistir en un nido de esferas membranosas concéntricas o en una simple bicapa continua de lípidos que rodea un compartimiento acuoso (fig. 4-10). Los liposomas son invaluable para investigar las propiedades de las membranas. Se pueden introducir proteínas de la membrana en los liposomas y estudiar su función en un ambiente mucho más simple que el de una membrana natural. También se han probado liposomas que contienen DNA o diferentes fármacos dentro de su compartimiento central como sistemas potencialmente transportadores para entregar materiales a células específicas del cuerpo (página 153).

En el cuadro 4-3 se comparan las propiedades de una bicapa artificial de lípidos con las de una membrana natural. Es evidente que son notablemente similares. Incluso el aspecto de una bicapa artificial en el microscopio electrónico (fig. 4-9, *c*) revela la misma imagen de tres capas observada en las membranas naturales. Sin duda, gran parte de la estructura y comportamiento de las membranas es resultado de la presencia de una bicapa de lípidos. Las propiedades no similares entre las dos, en particular de permeabilidad y resistencia eléctrica, se atribuyen a las proteínas de la membrana.

La presencia de una bicapa de lípidos tiene muchas consecuencias en la estructura y funcionamiento de la célula. Debido a la cohesión y formación espontánea de las bicapas nunca se observan membranas con bordes libres; siempre son estructuras íntegras continuas. Como resultado, las membranas forman extensas redes interconectadas que se

CUADRO 4-2. Composición de los lípidos de algunas membranas biológicas*

Lípido	Eritrocito humano	Mielina humana	Mitocondrias de corazón de ternera	E. coli
Ácido fosfatídico	1.5	0.5	0	0
Fosfatidilcolina	19	10	39	0
Fosfatidiletanolamina	18	20	27	65
Fosfatidilglicerol	0	0	0	18
Fosfatidilserina	8.5	8.5	0.5	0
Cardiolipina	0	0	22.5	12
Esfingomielina	17.5	8.5	0	0
Glucolípidos	10	26	0	0
Colesterol	25	26	3	0

* Los valores expresados son porcentaje en peso de los lípidos totales.

FUENTE: C. Tanford, *The Hydrophobic Effect*, p. 109, Wiley, 1980.

FIGURA 4-8 Cálculo de la superficie de una preparación de lípidos.

a) Cuando se disuelve una muestra de fosfolípidos en un solvente orgánico, como el hexano, y se extiende sobre una superficie acuosa, las moléculas de fosfolípidos forman una capa sobre el agua cuyo espesor es de una sola molécula: capa monomolecular. En esta capa las moléculas se orientan con sus grupos hidrófilos enlazados a la superficie del agua y sus cadenas hidrófobas dirigidas al aire. Para estimar la superficie que los lípidos cubrirían si fueran parte de una membrana, se comprimen las moléculas de dichos lípidos en el área más pequeña posible por medio de barreras desplazables. Mediante este tipo de aparato, Gorter y Grendel concluyeron que los eritrocitos contenían suficientes lípidos para formar una capa sobre su superficie de dos moléculas de espesor: una bicapa. b) Naturaleza de la bicapa de lípidos, según la propusieron Gorter y Grendel. Los grupos polares se dirigen hacia afuera y las colas de ácidos grasos hacia adentro.

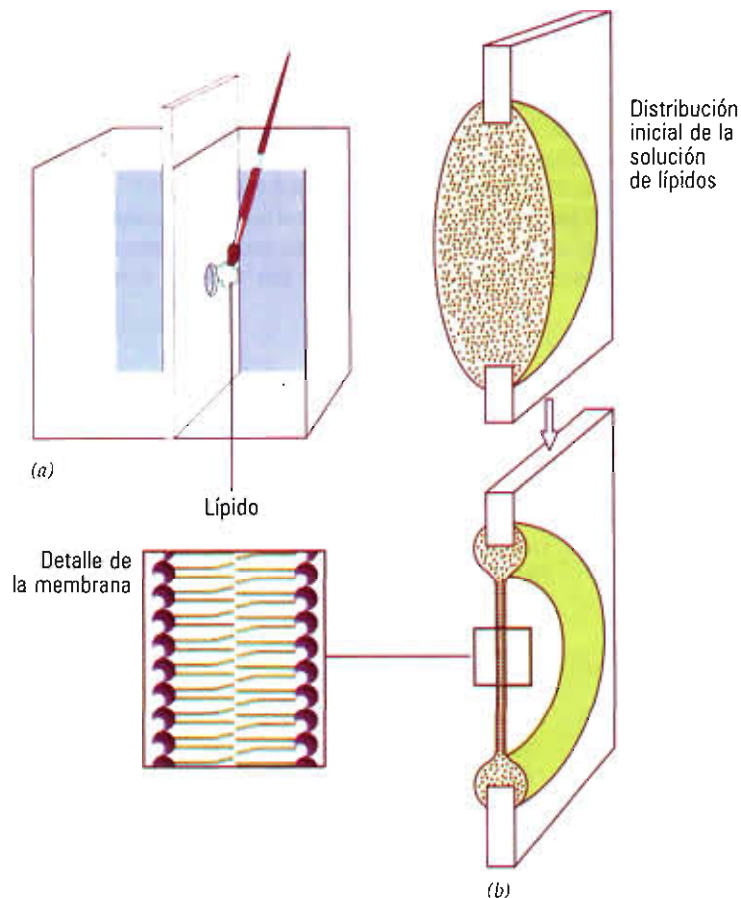
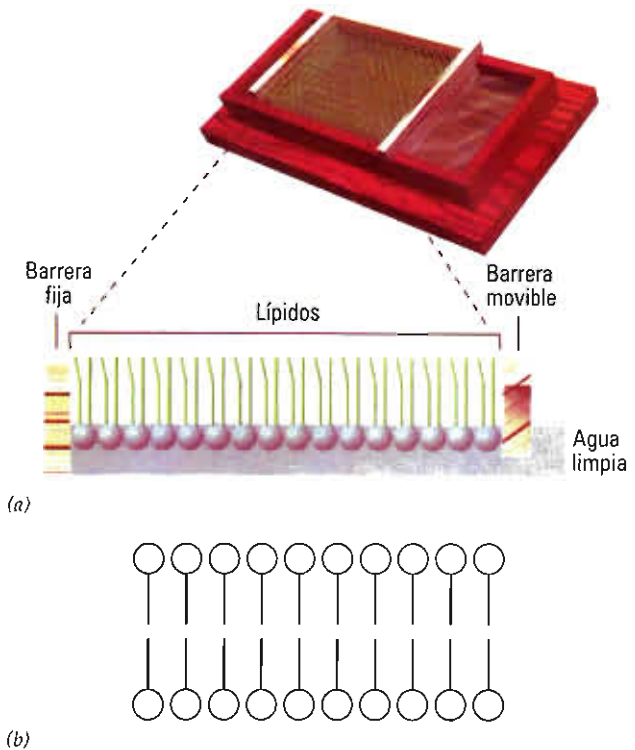


FIGURA 4-9 Procedimiento experimental para la preparación de bicapas artificiales. a) Los lípidos disueltos en un solvente se aplican con una brocha a través de un agujero practicado en una placa que separa dos cámaras acuosas. b) Inicialmente, la capa de lípidos es gruesa pero pronto se adelgaza de manera espontánea para formar la bicapa. c) Micrografía electrónica de una bicapa artificial de lípidos fijada con permanganato de potasio y nitrato de lantano que muestra el aspecto trilaminar en ausencia de proteínas. El borde oscuro y las líneas exteriores al parecer son los sitios de las cabezas polares. (c: Cortesía de Glen L. Decker.)



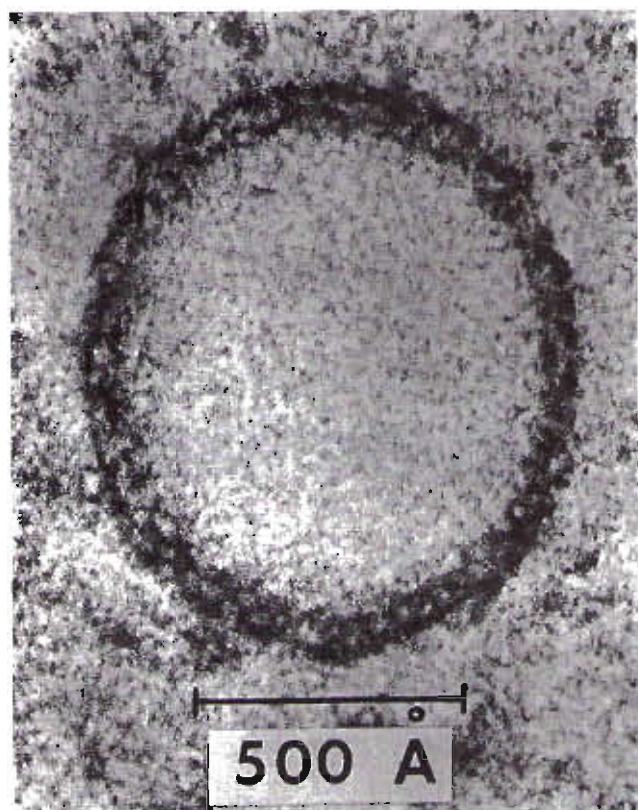


FIGURA 4-10. Un liposoma. Micrografía electrónica de un liposoma, que es una vesícula esférica cuya pared externa está compuesta de una sola bicapa continua de lípidos que rodea una cámara llena de líquido. Los liposomas se forman al suspender fosfolípidos en solución acuosa y luego sometiendo la suspensión a sonicación, lo que provoca que los lípidos se autoensamblen formando esas vesículas cerradas. (Cortesía de Walter Stoeckenius.)

ramifican a través de las células. Gracias a la flexibilidad de la bicapa de lípidos, las membranas son deformables y pueden cambiar toda su forma, como ocurre durante la loco-

moción (fig. 4-11, a) o la división celular (fig. 4-11, b). Se cree que la bicapa de lípidos facilita la fusión o el desdoblamiento de las membranas. Por ejemplo, durante la secreción, cuando las vesículas citoplásmicas se funden con la membrana plasmática, o la fertilización, cuando dos células se unen para formar una sola célula (fig. 4-11, c), participan procesos en los cuales dos membranas separadas se reúnen para constituir una capa continua.

La formación espontánea de bicapas de lípidos también es importante en las teorías de la evolución celular. Una capa externa que contiene lípidos proporciona la barrera necesaria para aislar el medio interno viviente cuyas propiedades son muy diferentes a las del medio externo. Según estudios de bicapas artificiales, puede esperarse que dicha barrera se forme de manera espontánea. La formación de una barrera alrededor del primer conjunto de moléculas autoduplicantes, al parecer fue el primer paso esencial en la evolución de las células.

Carbohidratos de la membrana

Las membranas plasmáticas de células eucariotas poseen carbohidratos unidos mediante enlaces covalentes a los componentes lípidos y proteínicos (fig. 4-4, b). Según la especie y el tipo de célula, el contenido de carbohidratos de la membrana plasmática varía entre 2 y 10% del peso. Por ejemplo, la membrana plasmática del eritrocito, mostrada en la figura 4-1, a, contiene alrededor de 52% de proteína, 40% de lípidos y 8% de carbohidratos. Del 8% de carbohidratos, cerca de 7% se une a lípidos mediante enlaces covalentes para formar glucolípidos, y el restante 93% se une a proteínas con enlaces covalentes para formar glucoproteínas. Como se indica en la figura 4-4, b, todos los carbohidratos de la membrana plasmática se enfrentan en el espacio extracelular. Los carbohidratos de las membranas celulares internas también suelen alejarse del citosol (la razón de esta orientación se ilustra en la figura 8-10).

En las glucoproteínas, el carbohidrato se presenta como un oligosacárido corto ramificado que en condiciones típicas posee menos de 15 azúcares por cadena. Los azúcares

CUADRO 4-3. Propiedades físicas de las membranas biológicas y de las bicapas de lípidos simples no modificadas

Propiedades	Membranas biológicas	Bicapa
Espesor (Å):		
Por microscopia electrónica	60-130	60-90
Por difracción de rayos X	75-100	—
Por método óptico	—	40-80
Por capacitancia y constante dieléctrica	30-150	40-130
Resistencia (Ω/cm)	10^2 - 10^5	10^6 - 10^8
Capacitancia ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$)	0.5-1.3	0.3-1.3
Potencial de reposo (mV)	10-90	0-140
Voltaje de desintegración (mV)	100	100-550
Índice de refracción	1.6	1.56-1.66
Tensión interfacial (ergios/ cm^2)	0.03-3.0	0.2-6.0
Permeabilidad al agua (10^{-4} cm/seg)	0.25-58	2.3-24

FUENTE: F. Vandenheuvel, *Adv. Lipid Res.* 9:173, 1971.

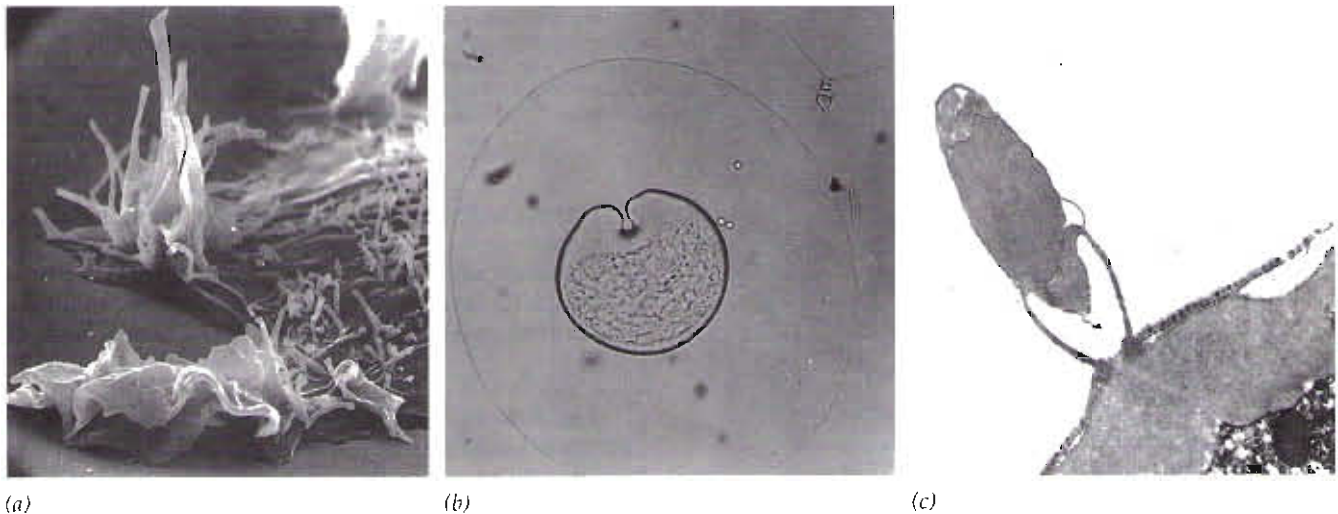


FIGURA 4-11. Propiedades dinámicas de la membrana plasmática. *a)* El borde delantero de una célula en movimiento casi siempre contiene sitios donde la membrana plasmática muestra surcos ondulantes. *b)* La división de una célula se acompaña de deformación de la membrana plasmática conforme es tirada hacia el centro de la célula. A diferencia de la mayor parte de las células en etapa de división, el surco de desdoblamiento de este huevo ctenóforo en división comienza en un polo y se desplaza unidireccionalmente a través del huevo. *c)* Las membranas pueden fusionarse con otras membranas. Este espermatozoide se encuentra en el proceso de fusionar su membrana plasmática con la del óvulo. (*a:* Cortesía de Jean Paul Revel; *b:* cortesía de Gary Freeman; *c:* cortesía de A.L. y L.H. Colwin.)

observados con mayor frecuencia en estas cadenas de carbohidratos se muestran en la figura 4-12, *a*. El ácido siálico por lo común es el azúcar terminal de los oligosacáridos y confiere carga negativa a las cadenas de carbohidratos. Los oligosacáridos pueden unirse a diferentes aminoácidos mediante dos tipos principales de ligaduras (fig. 4-12, *b*). Se piensa que estos carbohidratos ramificados participan en la mediación de las interacciones de la célula con otras células y también con su entorno no viviente (esto se analiza en el capítulo 7).

Todavía no se comprenden bien las funciones de los glucolípidos de la membrana, aunque se les pueden asignar ciertas propiedades. Por ejemplo, los carbohidratos de los glucolípidos de la membrana plasmática de eritrocitos determinan si el grupo sanguíneo de una persona es A, B, AB u O. Los determinantes ABO son cadenas cortas ramificadas de oligosacáridos (fig. 4-13). La persona con tipo sanguíneo A posee una enzima con una *N*-acetilgalactosamina en el extremo de la cadena, en tanto que una persona con sangre tipo B tiene una enzima que se une a galactosa en la cadena terminal. Las personas con tipo sanguíneo AB poseen ambas enzimas, en tanto que las personas con sangre tipo O carecen de enzimas capaces de unirse a cualquier azúcar terminal. También se ha demostrado que los glucolípidos participan en ciertas enfermedades infecciosas; la toxina del cólera y el virus de la influenza penetran en su célula específica uniéndose primero a los gangliósidos de la superficie celular. Si los glucolípidos pueden funcionar como "compuertas" para la entrada de patógenos, tal vez tengan algún tipo de función receptora en las células normales. En contraste con la mayor parte de los carbohidratos de peso molecular elevado (como glucógeno, almidón o celulosa), los cuales son polímeros de un solo azúcar, los oligosacáridos unidos a proteínas y lípidos de la membra-

na muestran considerable variabilidad estructural. Por consiguiente, estas cadenas de oligosacáridos pueden mostrar especificidad en sus propias interacciones y con otros tipos de moléculas.

Proteínas de la membrana

Según el tipo de célula y el organelo particular del interior de dicha célula, una membrana puede contener desde una docena hasta más de 50 proteínas diferentes. Estas proteínas no se disponen al azar dentro de la membrana, sino que cada una se localiza y orienta en una posición particular respecto de la bicapa de lípidos. Es digno de notar que todas las proteínas de la membrana se sitúan asimétricamente de modo que las propiedades de la porción externa de la membrana son muy diferentes a las de la porción interna. Como resultado de esta "lateralidad" de la membrana, las proteínas de partes de la membrana que interactúan con otras células o con ligandos extracelulares, como hormonas o factores de crecimiento, se enfrentan al exterior, en tanto que las proteínas de las partes de la membrana que interactúan con moléculas citoplásmicas, como proteínas G o proteincinasas (capítulo 15), enfrentan el interior de la célula. Las proteínas de la membrana se pueden agrupar en tres tipos distintos según la intimidad de su relación con la bicapa de lípidos (fig. 4-14). Estos grupos son:

1. **Proteínas integrales**, que penetran en la bicapa de lípidos. En realidad, prácticamente todas las proteínas integrales atraviesan por completo la bicapa de lípidos y por lo tanto tienen dominios que sobresalen en ambos lados de la membrana, el extracelular y el citoplásmico.
2. **Proteínas periféricas**, que se localizan por completo fuera de la bicapa de lípidos, sobre la superficie extracelular o citoplásmica, pero todavía relacionadas con la

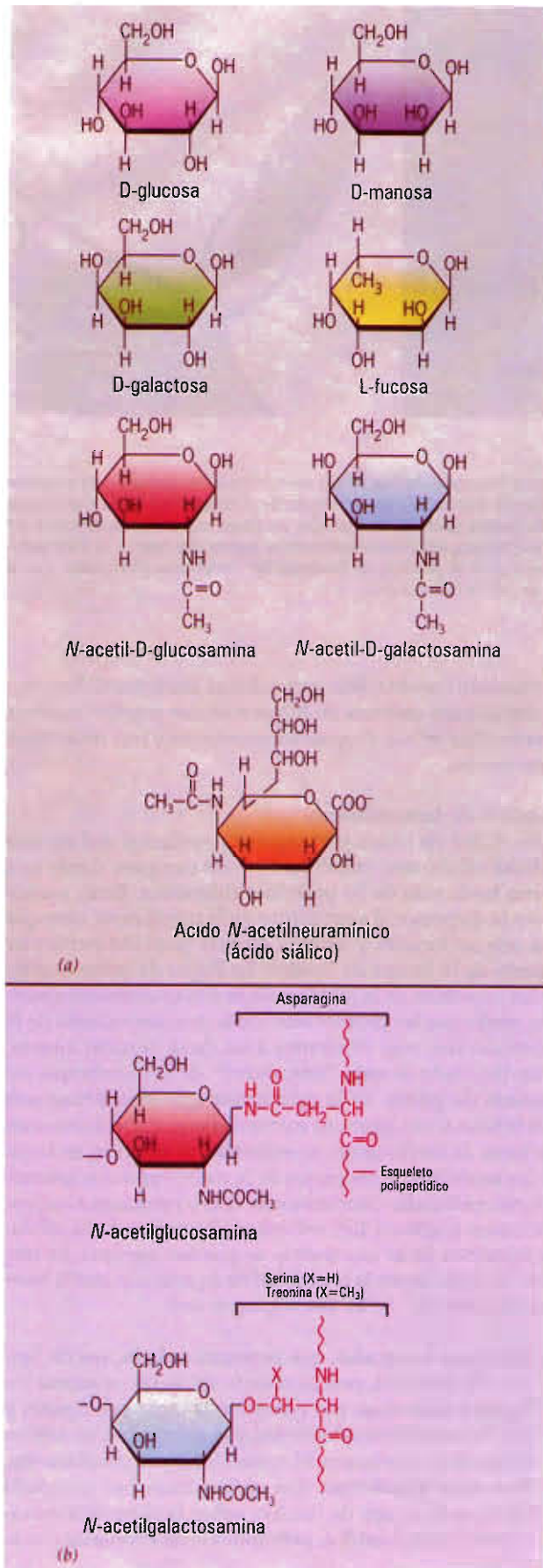


FIGURA 4-12. Carbohidratos de la membrana. a) Estructura química de los azúcares predominantes en la membrana. b) Los dos tipos de enlace que unen azúcares a una cadena de polipéptidos. La unión *N*-glucosídica entre asparagina y *N*-acetilglucosamina es más común que la unión *O*-glucosídica entre serina o treonina y *N*-acetilgalactosamina.

superficie de la membrana mediante enlaces no covalentes.

3. **Proteínas ancladas a lípidos**, localizadas fuera de la bicapa de lípidos, pero unidas mediante enlaces covalentes a una molécula lípida situada dentro de la bicapa.

Proteínas integrales de la membrana. Igual que los fosfolípidos de la bicapa, las proteínas integrales de la membrana también son anfipáticas y presentan porciones hidrófilas e hidrófobas. A diferencia de las proteínas solubles del citoplasma, que tienden a presentar un núcleo hidrófobo y una superficie hidrófila (fig. 2-28), las proteínas integrales de la membrana contienen residuos no polares en gran parte de su superficie expuesta. Estas regiones no polares de la proteína se integran al interior de la bicapa de lípidos donde pueden sufrir interacciones hidrófobas con cadenas lípidas acilo (fig. 4-14). La función de estos dominios hidrófobos para introducir proteínas en la "pared" lípida de la membrana es muy parecida a la de ganchos que pueden introducirse en los orificios de un perchero. El resto de una proteína integral se compone principalmente de aminoácidos iónicos y polares no integrados a la bicapa que sobresalen

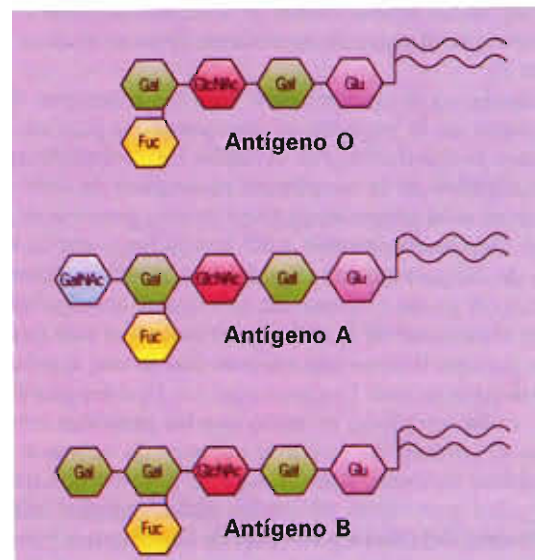


FIGURA 4-13. Antígenos de los grupos sanguíneos. El tipo sanguíneo de una persona (A, B, AB u O) es determinado por una corta cadena de azúcares unidos mediante enlace covalente a lípidos y proteínas de la membrana del eritrocito. Aquí se muestran los oligosacáridos unidos a los lípidos de la membrana (que forman un gangliósido) que producen los tipos sanguíneos A, B y O. Una persona con tipo sanguíneo AB tiene gangliósidos con ambas estructuras, A y B.

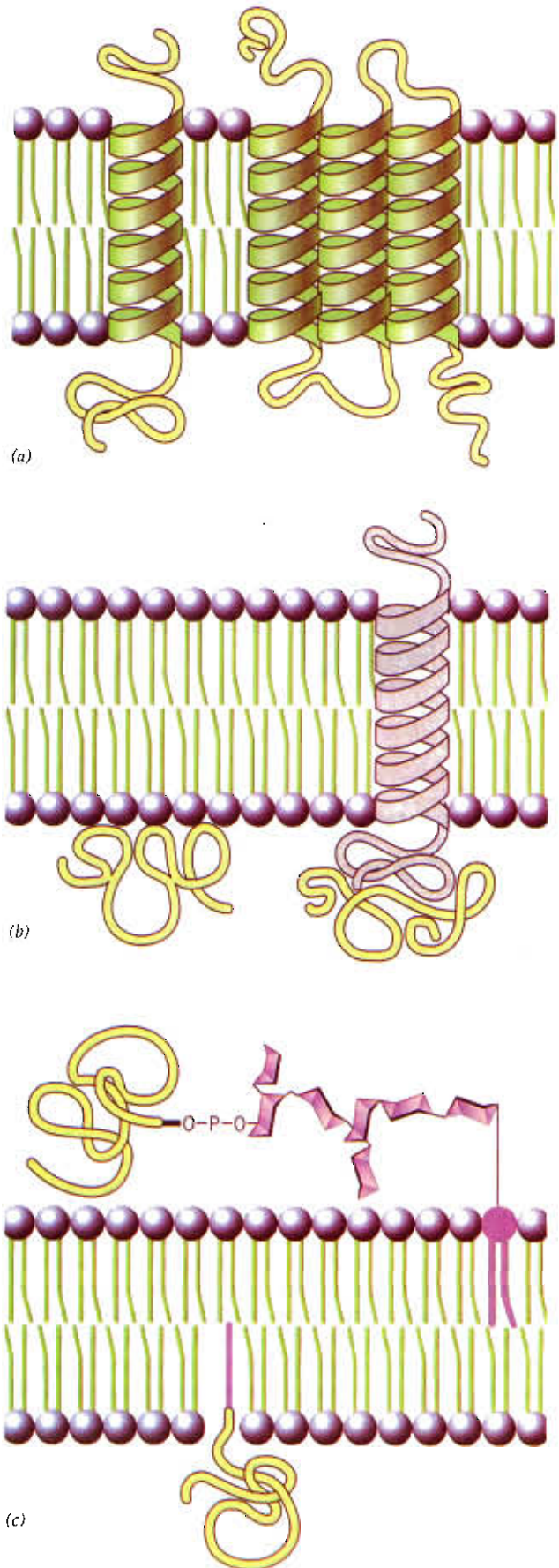
FIGURA 4-14. Tres clases de proteínas de la membrana. *a)* Proteínas integrales que pueden contener una o más hélices que atraviesan la membrana. *b)* Proteínas periféricas de la superficie interna de la membrana que mantienen uniones no covalentes con los grupos polares de la bicapa de lípidos o con alguna proteína integral de la membrana. *c)* Proteínas ancladas en lípidos, las cuales pueden enlazarse en forma covalente a un fosfolípido o a un ácido graso integrado en la bicapa de lípidos.

len del borde de la bicapa en uno o ambos lados o forman un canal acuoso a través de la misma. Estos dominios hidrófilos son las partes de una proteína integral que pueden interactuar con sustancias hidrosolubles (iones, sustratos de bajo peso molecular, hormonas y otras proteínas) en la superficie de la membrana o dentro de un canal central. Como veremos más adelante, no es necesario que las proteínas integrales sean estructuras fijas, sino más bien deben tener capacidad para desplazarse lateralmente dentro de la propia membrana.

Debido a su superficie hidrófoba, las proteínas integrales de la membrana son difíciles de extraer y de estudiar. La extracción de estas proteínas de membrana de ordinario se logra con ayuda de un detergente. Los detergentes son compuestos anfipáticos (fig. 2-20) con un extremo polar y una cadena no polar de carbohidratos. Gracias a esta estructura, los detergentes pueden sustituir a los fosfolípidos estabilizantes de las proteínas integrales en tanto mantienen su solubilidad en solución acuosa. Una vez que las proteínas se solubilizan por acción del detergente, se pueden efectuar varios procedimientos analíticos para determinar los aminoácidos que componen a la proteína, su peso molecular, la secuencia de aminoácidos, y algo más.

La orientación de una proteína dentro de la membrana se puede determinar experimentalmente utilizando agentes no penetrantes, como marcadores o modificadores de las proteínas. Consideremos lo que ocurre cuando se trata una preparación de células intactas con una enzima proteolítica como la tripsina, demasiado grande para atravesar la membrana plasmática (fig. 4-15, *a*, recuadro superior). Las partes de las proteínas de membrana situadas en el lado externo de la bicapa de lípidos serán digeridas por la enzima añadida, pero las partes situadas entre la bicapa o en la cara de la membrana enfrentada al citoplasma no serán afectadas. El efecto del tratamiento puede determinarse extrayendo las proteínas y sometiénolas a electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio (fig. 4-15, *b*). La proteína con parte de su estructura digerida se desplaza a una posición diferente en el gel cuando se compara con la misma proteína de una membrana no tratada. Para determinar si una parte de la proteína sobresale de la cara citoplásmica de la membrana se puede incrementar la permeabilidad de las células mediante tratamiento con detergentes no iónicos o por choque osmótico (fig. 4-31, *b*). En estas condiciones, la membrana plasmática ya no actúa como barrera para la penetración de las enzimas proteolíticas, de modo que las partes citoplásmicas de la proteína también sufrirán la digestión enzimática (parte inferior de la figura 4-15, *a, b*).

Una manera alternativa de predecir la organización de una proteína integral de membrana es a partir de la secuen-



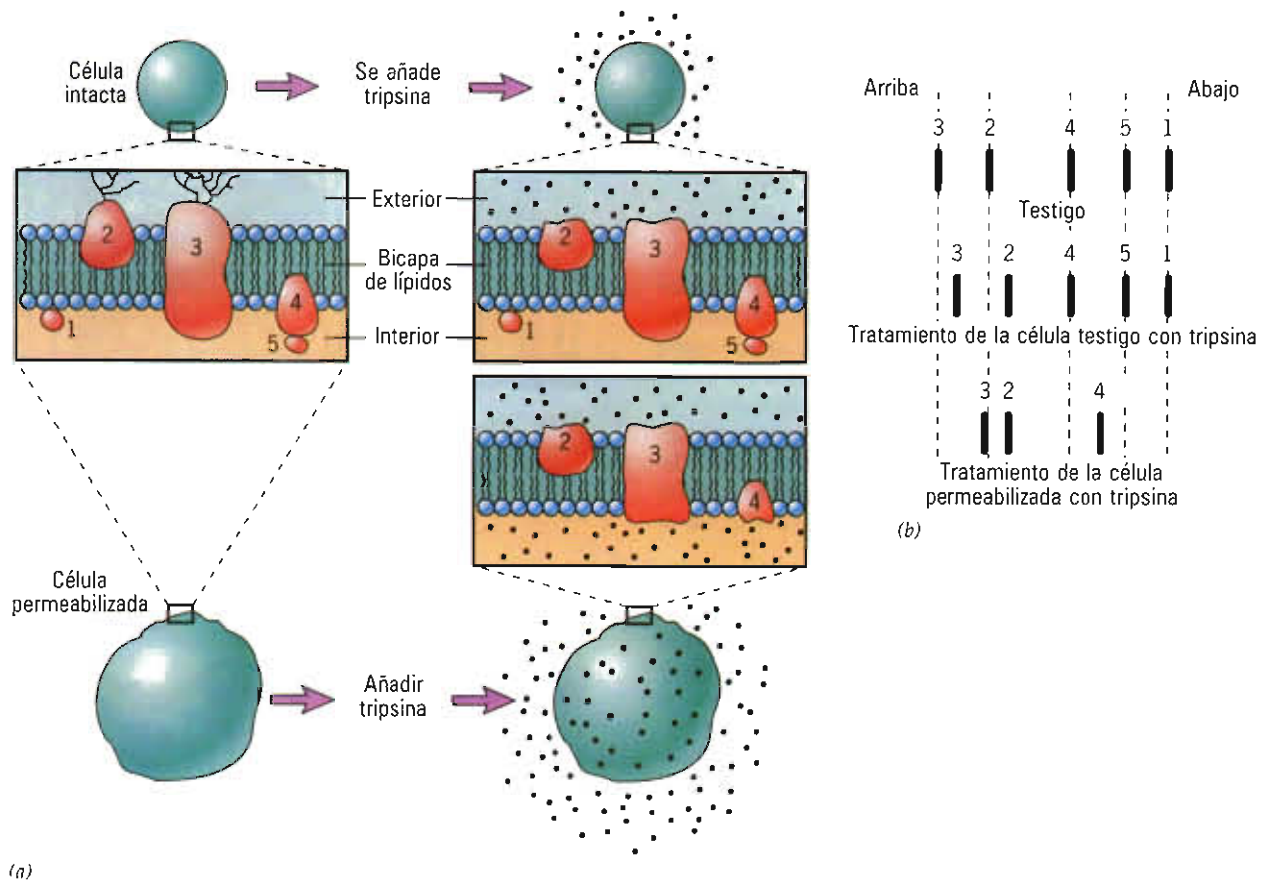


FIGURA 4-15. Procedimiento experimental para determinar la orientación de las proteínas dentro de una membrana plasmática. La hipotética membrana estudiada contiene cinco proteínas distintas. *a)* Las células intactas se tratan con tripsina, una enzima no penetrante, para digerir las partes de la proteína proyectadas al medio externo. Por lo contrario, si la célula se vuelve permeable (por extracción con detergentes no iónicos o exposición a un medio hipotónico), las partes de las proteínas de membrana proyectadas al interior del citoplasma también son accesibles a la digestión proteolítica. *b)* Esquema de los resultados de la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (EGPA-DSS) que muestra el patrón de bandas que se obtiene en el experimento descrito en *a*. La velocidad de migración de las proteínas durante la electroforesis es inversamente proporcional a su peso molecular. Por lo tanto, las proteínas a las que se suprime una parte se desplazan con mayor rapidez a través del gel. Al concluir el experimento, estas proteínas están más cerca del borde inferior del gel, o sea, recorren una mayor distancia en comparación con la que hubieran recorrido si no fueran tratadas con la enzima.

cia de aminoácidos de dicha proteína, que puede deducirse de la secuencia de nucleótidos de un gen aislado. En condiciones típicas se puede predecir que los segmentos de una proteína que atraviesan la membrana constan de una cadena de 20 a 25 aminoácidos no polares que tal vez formen una hélice alfa. Esta suposición depende de numerosos estudios, los cuales han demostrado que esos segmentos de proteína que atraviesan la bicapa de lípidos, los segmentos **transmembrana**, de ordinario consisten en aminoácidos no polares organizados en conformación alfa helicoidal. La glucoforina A, principal proteína de la membrana plasmática del eritrocito, es un ejemplo de proteína integral con una sola hélice alfa hidrófoba transmembrana (fig. 4-16).

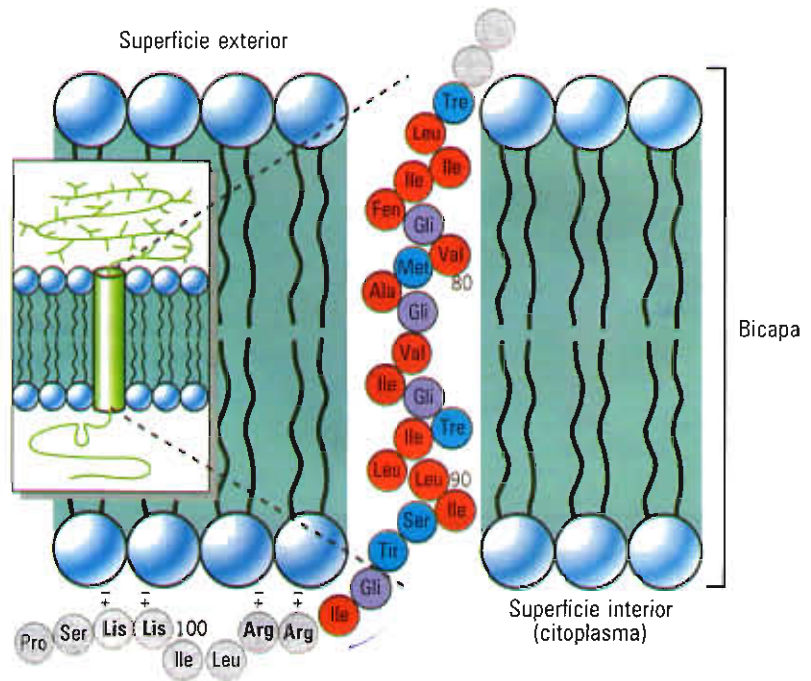
Sin embargo, hay una importante excepción a la regla de las hélices transmembrana predominantemente hidrófobas. Muchas proteínas integrales de la membrana contienen un canal acuoso para permitir el paso de iones o de solutos polares a través de la bicapa de lípidos. Se cree que las paredes de estos canales acuosos contienen: 1) hélices

anfipáticas en las cuales una cara de cada hélice consta de aminoácidos no polares enfrentados a la bicapa de lípidos, en tanto que la cara opuesta contiene principalmente residuos polares enfrentados al poro (fig. 4-17), o 2) un borde de láminas beta muy similar al barril beta ilustrado en la figura 5-3.

Las proteínas integrales se pueden clasificar de la siguiente manera:

1. **Proteínas monotópicas** integradas a la bicapa de lípidos y expuestas en una sola superficie de la membrana. Estas proteínas son raras, si en realidad existen. Se cree que el citocromo b_5 , una proteína de las membranas citoplásmicas, es una proteína monotópica, pero no hay acuerdo unánime.
2. **Proteínas bitópicas** que poseen un segmento dentro de la membrana y por lo tanto la atraviesan una sola vez y están expuestas en ambos lados de la membrana (fig. 4-16). Esta clase incluye gran variedad de receptores de

FIGURA 4-16. Glucoforina A, una proteína integral con un solo dominio transmembrana. La hélice α simple que atraviesa la membrana contiene predominantemente residuos hidrófobos. (Los aminoácidos de la hélice se muestran con un color codificado según el carácter de su grupo R, igual que en la figura 2-26.) Se cree que los cuatro aminoácidos con carga positiva del dominio citoplásmico de la proteína de membrana forman enlaces iónicos con grupos cargados negativamente en las cabezas de los lípidos. Los carbohidratos están unidos a ciertos residuos de aminoácidos en la superficie externa de la proteína. Todos los oligosacáridos, excepto uno, mantienen enlaces O (la excepción es el oligosacárido unido al residuo de asparagina en la posición 26). En la página 139 se analiza el papel de la glucoforina en la membrana del eritrocito.



la membrana plasmática que enlazan diferentes ligandos en su superficie externa (p. ej., un factor de crecimiento, un péptido hormona o un antígeno) y transmiten un mensaje a través de la membrana hacia el citoplasma por medio del segmento que atraviesa dicha membrana (fig. 15-25).

3. **Proteínas politópicas** que poseen más de un segmento dentro de la membrana y por lo tanto se entrelazan avanzando y retrocediendo a lo largo de la membrana. Esta clase incluye las proteínas que forman canales para el paso de iones y solutos a través de la membrana plasmática y también proteínas con otras funciones (p. ej., el receptor para la partícula señal del receptor del retículo endoplásmico, el receptor adrenérgico que se enlaza a la epinefrina, el pigmento fotosensible de los bastoncillos de la retina, y los polipéptidos M y L del centro de reacción fotosintética de las bacterias, que se muestra en la página 115). El centro de reacción bacteriana contiene proteínas integrales cuya disposición precisa dentro de la membrana fue descrita por primera vez mediante cristalografía de rayos X.

Proteínas periféricas de la membrana. Las proteínas periféricas se unen a la membrana mediante débiles enlaces electrostáticos, sea a grupos hidrófilos de la cabeza de los lípidos o a porciones hidrófilas de las proteínas integrales que sobresalen de la bicapa (fig. 4-14). Las proteínas periféricas de ordinario se solubilizan mediante extracción con soluciones acuosas salinas concentradas o pH alcalino. En realidad, la distinción entre proteínas integrales y periféricas es incierta, porque muchas proteínas de membrana contienen varios polipéptidos, algunos de los cuales penetran en la bicapa de lípidos y otros permanecen en la periferia.

Las proteínas periféricas mejor estudiadas (principalmente de la familia espectrina) se localizan en la superficie interna de la membrana plasmática (fig. 4-31). Estas proteínas forman una red fibrilar que actúa como "esqueleto" flexible para suministrar apoyo mecánico a la membrana cuando se producen cambios rápidos en la morfología celular y también para fijar las proteínas integrales de la membrana. Otras proteínas periféricas sobre la superficie interna de la membrana funcionan como enzimas o factores transmisores de señales a través de la membrana. La superficie

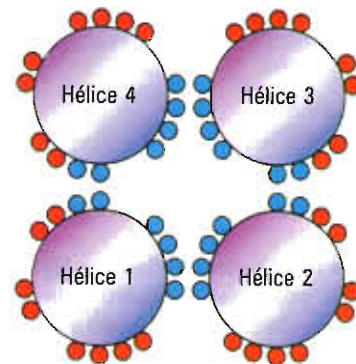
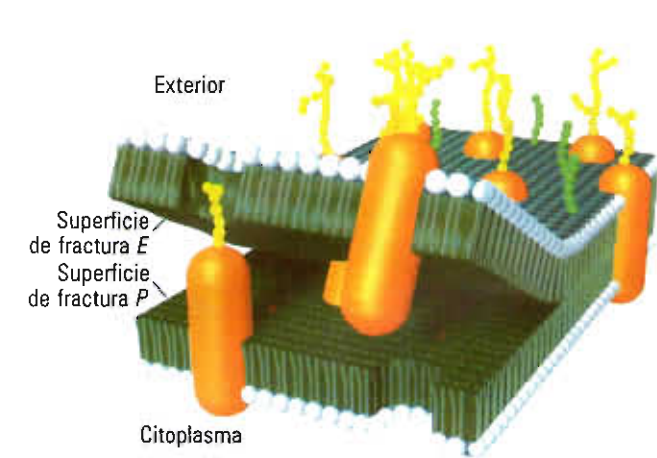
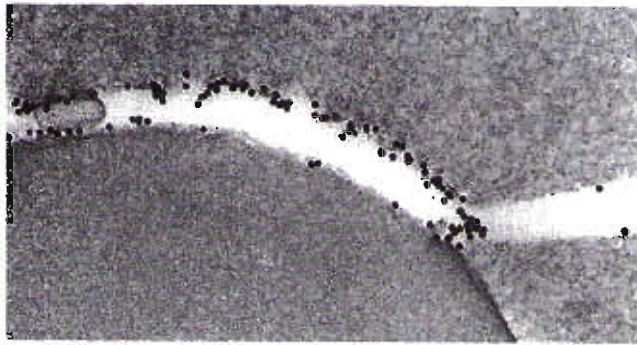


FIGURA 4-17. Representación esquemática de cuatro hélices α originadas como un haz dentro de la membrana. Los círculos pequeños en azul representan cadenas laterales polares (grupos R) asociadas al centro del complejo, en tanto que los pequeños círculos rojos representan residuos no polares relacionados con la bicapa de lípidos que los rodean. Nótese que las cadenas laterales en realidad se proyectan desde el esqueleto en toda la longitud de cada hélice a diferentes niveles; para representarlos en la figura se reducen a un solo plano.



(a)

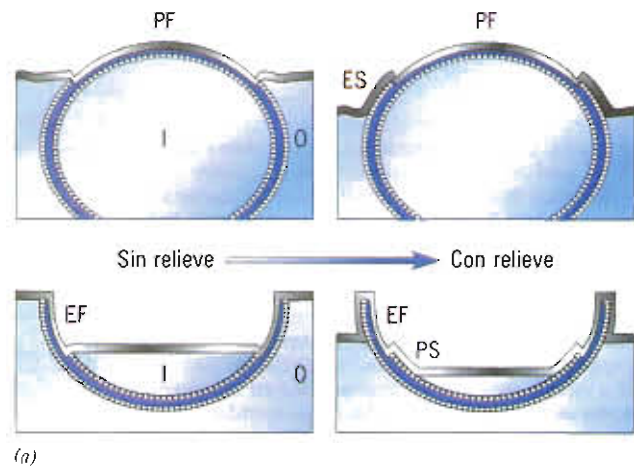


(b)

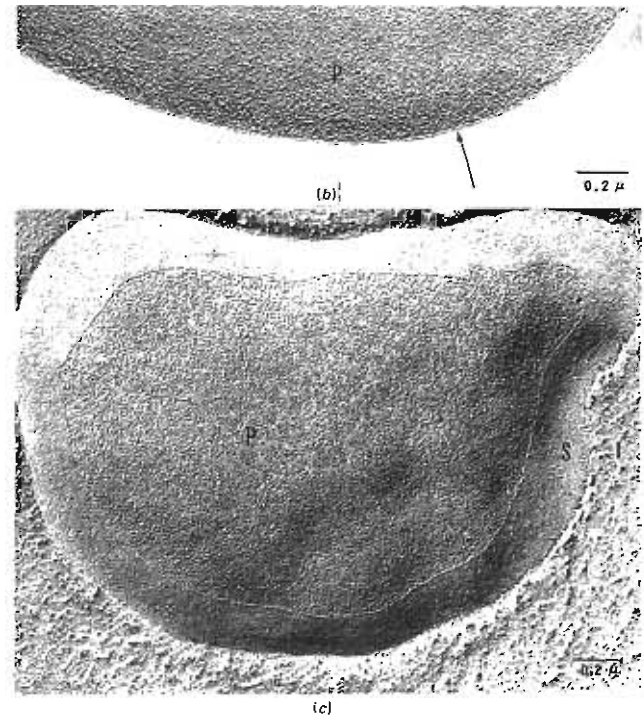
FIGURA 4-18. Fractura por congelación: técnica para investigar la estructura de la membrana celular. a) Cuando se golpea un bloque de tejido congelado con una hoja cortante, el plano de fractura que atraviesa el tejido casi siempre pasa por enmedio de la bicapa de lípidos. El plano de fractura rodea las proteínas en vez de romperlas a la mitad y las separa en una de las dos mitades de la bicapa. b) Esta micrografía muestra la superficie de un eritrocito congelado y luego fracturado, pero en vez de preparar una réplica, se dejó derretir y el tejido se coloreó con un marcador para los grupos carbohidratos que sobresalen en la superficie externa de la proteína integral glucoforina (fig. 4-16). Se puede observar que la glucoforina al separarse muestra preferencia por la mitad externa de la membrana. (b: Según Pedro Pinto da Silva y Maria R. Torrisi, J. Cell Biol. 93:467, 1982; con permiso de Rockefeller University Press.)

extracelular de la membrana plasmática también puede contener proteínas periféricas, pero estas proteínas están menos bien definidas.

Proteínas de membrana ancladas a lípidos. Se distinguen dos tipos de proteínas de membrana ancladas a lípidos, según los tipos de anclaje al lípido y la superficie de la membrana sobre la cual están expuestos. Varias proteínas presentes en la cara externa de la membrana plasmática se enlazan a ésta mediante un oligosacárido corto unido a una molécula de glucofosfatidilinositol (GFI) integrada a la hoja externa de la bicapa de lípidos (fig. 4-14, c). La presencia de estas proteínas ancladas al GFI fue descubierta cuando se demostró que ciertas proteínas de la membrana podían liberarse mediante una fosfolipasa que reconocía y rompía específicamente a los fosfolípidos que contienen inositol.



(a)



(c)

FIGURA 4-19. Efecto de la técnica al "aguafuerte" sobre una preparación de fractura por congelación. a) En tanto el procedimiento de fractura expone el interior de la membrana (las superficies de fractura E y P, EF y PF), el proceso al aguafuerte expone una parte de las superficies interna y externa de la membrana (superficies E y P, ES y PS). b) Réplica de una parte del eritrocito humano tratado con la técnica de fractura por congelación. Se observa que la superficie de fractura P está cubierta con partículas de 8 nm de diámetro, aproximadamente. Un pequeño surco (flecha) marca el sitio de unión de la superficie cubierta de partículas y el hielo que la rodea. c) Réplica de un eritrocito fracturado por congelación y cuyo relieve se fijó con técnica al "aguafuerte". Durante el proceso, la sublimación del hielo expone una superficie lisa (S) claramente demarcada en la superficie interna P de fractura. (a: Según Pedro Pinto da Silva y Daniel Branton, J. Cell Biol. 45:599, 1970; b-c: según Thomas W. Tillack y Vincent T. Marchesi, J. Cell Biol. 45:649, 1970; con permiso de Rockefeller University Press.)

Otro grupo de proteínas presentes en el lado *citoplásmico* de la membrana plasmática se encuentra anclado a la membrana mediante largas cadenas de hidrocarburos integradas a la hoja interna de la bicapa de lípidos (fig. 4-14, c). Al menos dos proteínas relacionadas en esta forma con la membrana plasmática (Src y Ras) han sido implicadas en la transformación de células normales a estados malignos.

Distribución de las proteínas integrales: análisis de fracturas por congelación y de imágenes por congelación “al agua fuerte”

El concepto de que las proteínas pueden atravesar todo el espesor de la membrana en vez de limitarse simplemente al exterior de la bicapa se originó principalmente de los resultados de una técnica llamada **uplicación por fractura de muestras congeladas** (véase sección 17-2). En este procedimiento, el tejido se solidifica por congelación y luego se golpea el bloque congelado con una hoja afilada para fracturarlo en dos pedazos. El plano de fractura se sitúa con mayor frecuencia entre las dos hojas de la bicapa de lípidos (fig. 4-18). Una vez abierta la membrana en esta forma se depositan metales sobre las superficies expuestas para formar una réplica en relieve que puede observarse con el microscopio electrónico. Como se muestra en la figura 4-19, esta réplica parece un camino regado de grandes pedruzcos llamados **partículas relacionadas con la membrana**. Puesto que el plano de fractura pasa a través del centro de la bicapa, estas partículas corresponden a proteínas integrales de la membrana extendidas cuando menos hasta la mitad del espesor de la capa de lípidos situada en el centro de la membrana. Cuando el plano de fractura alcanza a determinada partícula, la rodea en vez de romperla a la mitad. En consecuencia, cada proteína (partícula) se separa unida a una mitad de la membrana plasmática y deja el correspondiente “hoyuelo” en la otra mitad. En la figura 4-19, *a*, se muestra la relación entre fracturas en la cara interna P (*protoplásmica*) y fracturas en la cara externa E (*ectoplásmica*). En la figura 4-19, *b*, se muestra la naturaleza particular de la cara con fracturas P en la membrana del eritrocito humano.

La técnica de fractura por congelación no sólo permite visualizar las proteínas integrales de la membrana, sino que también se puede modificar para revelar proteínas periféricas o partes de las proteínas integrales presentes en la *superficie* de las membranas interna (P) o externa (E). Para examinar las superficies de la membrana se debe efectuar un paso adicional en el procedimiento antes de cubrir las caras fracturadas con metal (sombreado) para observarlas en el microscopio electrónico. La muestra congelada y fracturada se expone al vacío durante un corto tiempo, durante el cual una delgada capa de hielo de ambas superficies, superior e inferior, de la membrana se evapora sin pasar por el estado líquido (sublimación) (fig. 4-19, *a*). Al cubrir esta superficie con el metal se puede observar su textura en la réplica (porción marcada con S en la figura 4-19, *c*). Este procedimiento de sublimación se denomina **congelación al “agua fuerte”**. El gran valor de las técnicas de fractura por congelación y congelación al “agua fuerte” es que permiten investigar la heterogeneidad microscópica de la membrana. En la réplica aparecen y pueden identificarse diferencias localizadas en partes de la membrana, como se muestra en la figura 4-20

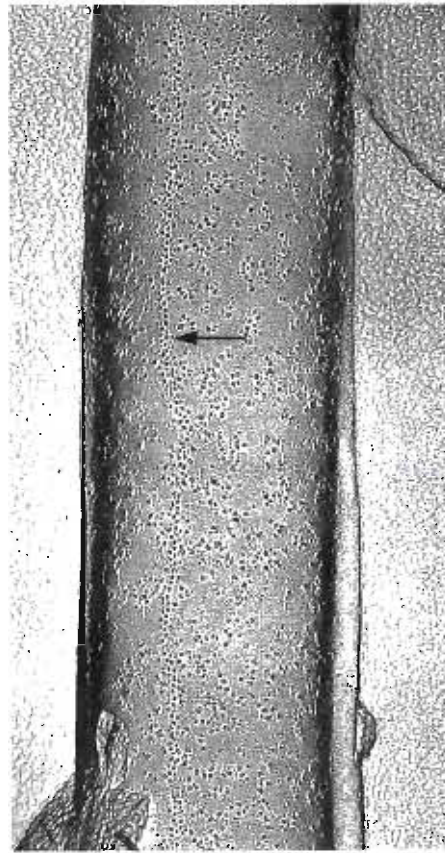


FIGURA 4-20 Distribución heterogénea de las proteínas integrales de membrana. Cuando se expone la membrana plasmática del flagelo de un espermatozoide de mamífero durante fractura por congelación, se puede observar que contiene una doble fila de partículas denominadas “cierres automáticos” (flecha). La técnica de fractura por congelación es ideal para revelar este tipo de heterogeneidad microscópica dentro de una membrana. En la figura 4-30 se muestra la distribución de proteínas específicas en la membrana del espermatozoide a una escala mayor. (Cortesía de Daniel S. Friend.)

de una pequeña porción del espermatozoide. A diferencia del análisis bioquímico, las observaciones microscópicas no promedian a todos los individuos de la población, sino que los muestran tal como pueden apreciarse.

4-3 Lípidos y fluidez de la membrana

El estado físico de los lípidos de una membrana puede describirse por su fluidez (o viscosidad).¹ Igual que muchas otras sustancias, los lípidos pueden existir en fase sólida cristalina o en fase líquida de viscosidad variable, según la temperatura. Por ejemplo, consideremos una sencilla bicapa artificial hecha de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina cuyos ácidos grasos son principalmente insaturados. Si la temperatura de la bicapa se mantiene relativamente alta (p. ej., 37°C), el lípido existe en estado relativamente fluido,

¹ Fluidez y viscosidad guardan relación inversa; la fluidez es una medida de la facilidad para fluir y viscosidad es la resistencia a fluir.

(a) Arriba de la temperatura de transición



(b) Abajo de la temperatura de transición

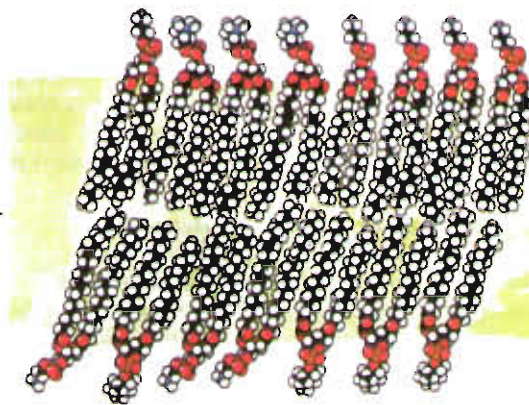


FIGURA 4-21. La estructura de la bicapa de lípidos depende de la temperatura. La bicapa aquí mostrada se compone de dos fosfolípidos, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. *a)* Arriba de la temperatura de transición, las moléculas de lípidos y sus extremos hidrófobos tienen libertad de movimiento en ciertas direcciones, aunque retienen un grado de orden considerable. *b)* Por debajo de la temperatura de transición el movimiento de las moléculas se restringe en forma notable y toda la bicapa puede describirse como un gel cristalino congelado. (Según R.N. Robertson, *The Lively Membranes*, Cambridge University Press, 1983. Reimpreso con autorización de Cambridge University Press.)

semejante al líquido (fig. 4-21, *a*). A esta temperatura, la bicapa de lípido se describe mejor como un cristal líquido bidimensional. Igual que en un cristal, las moléculas aún mantienen una orientación específica; en este caso, los ejes longitudinales de las moléculas permanecen prácticamente paralelos entre sí, pero los fosfolípidos individuales son capaces de girar o desplazarse lateralmente en el plano de la bicapa. Si la temperatura disminuye lentamente, se alcanza un punto donde ocurre un cambio distintivo en la naturaleza de la bicapa (fig. 4-21, *b*). El lípido pasa de su estado normal semejante a líquido a un gel cristalino “congelado” donde el movimiento de los fosfolípidos está muy restringido. La temperatura a la cual ocurre este cambio se denomina *temperatura de transición*.

La temperatura de transición de una bicapa particular depende de los lípidos particulares que la constituyen. El determinante de mayor importancia es el grado de insaturación de las cadenas ácidas acilo de los fosfolípidos, o sea, su contenido en dobles enlaces (específicamente enlaces *cis*). La temperatura de transición y la fluidez son determinadas por la capacidad de la molécula para compactarse. Aunque los ácidos grasos saturados tienen forma de barras rectas y los ácidos grasos *cis* insaturados presentan incurvaciones en la cadena donde se localizan los dobles enlaces (figs. 2-19

y 4-21), los fosfolípidos con cadenas saturadas pueden compactarse más firmemente que los que contienen cadenas insaturadas. Cuanto mayor sea el grado de insaturación de los ácidos grasos de la bicapa, *menor* será la temperatura necesaria para que la bicapa pase al estado de gel (cuadro 4-4).

El límite dentro del cual los diferentes lípidos cambian de fase es muy amplio. Por ejemplo, se pueden sintetizar varias fosfatidilcolinas y emplearlas para formar bicapas cuya temperatura de transición varía desde temperaturas menores de 0°C hasta mayores de 60°C. Las moléculas de colesterol alineadas con las cadenas lípidas acilo de los fosfolípidos de la bicapa (fig. 4-7) afectan la fluidez de la membrana al alterar la manera de compactarse de las cadenas de hidrocarburos. Como resultado, el colesterol tiende a evitar temperaturas de transición bruscas y también puede incrementar la estabilidad y disminuir la permeabilidad de la membrana.

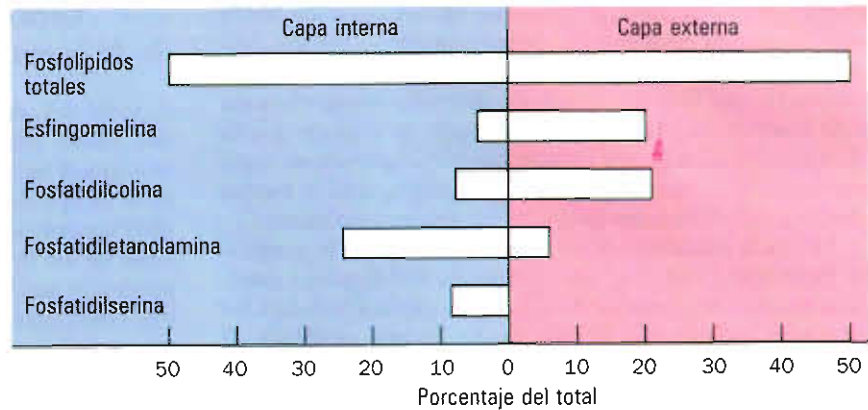
Importancia de la fluidez de la membrana

¿Qué papel representa el estado físico de la bicapa de lípidos en las propiedades biológicas de la membrana? Al parecer, la fluidez de la membrana corresponde a un compromiso perfecto entre estructura rígida ordenada sin posibilidad de movimientos y líquido no viscoso totalmente fluido en el cual los componentes de la membrana no pueden mantener una orientación determinada y carecen de oportunidad para organizarse y suministrar apoyo mecánico. La fluidez es importante porque permite que ocurran interacciones dentro de la membrana. Por ejemplo, gracias a la fluidez de la membrana algunas proteínas se ensamblan en un sitio particular de la membrana y forman estructuras especializadas como uniones intercelulares, compuestos que captan luz y sinapsis. La transferencia de señales a través de la

CUADRO 4-4. Punto de fusión de los ácidos grasos comunes con función lípida en el carbono 18

Ácido graso	Dobles enlaces	Punto de fusión (°C)
Ácido esteárico	0	70°
Ácido oleico	1	13°
Ácido α -linoleico	2	-9°
Ácido linolénico	3	-17°

FIGURA 4-22. Distribución asimétrica de fosfolípidos en la membrana plasmática del eritrocito humano.



membrana plasmática requiere de la interacción de receptores transmembrana que se unen a ligandos sobre la superficie externa de la membrana y estimulan enzimas situadas en la superficie interna de la misma. Debido a la fluidez de la membrana, las moléculas que interactúan pueden reunirse, efectuar la reacción necesaria y separarse. La fluidez también tiene relación con el ensamblado de la membrana, tema que analizaremos en la sección 8-3. Las membranas sólo se originan a partir de membranas preexistentes y crecen mediante un proceso que añade componentes lípidos y proteínas a la matriz líquida de una hoja membranosa. Muchos de los procesos celulares más básicos, incluyendo movimiento celular, crecimiento de la célula y división de la misma, formación de uniones intercelulares, secreción y endocitosis, dependen de movimientos de los componentes de la membrana y tal vez no serían posibles si la membrana fuera una estructura rígida no fluida.

Conservación de la fluidez de la membrana

La temperatura interna de la mayor parte de los organismos (que no sean aves ni mamíferos) varía con la temperatura ambiental. Para muchas actividades de la célula es indispensable que la membrana permanezca en estado fluido, por tanto las células deben tener capacidad para regular la fluidez de su membrana frente a condiciones variables controlando el tipo de fosfolípidos que las constituyen. La conservación de la fluidez de la membrana es un ejemplo de homeostasis a nivel celular y puede demostrarse de varias maneras. Por ejemplo, cuando disminuye la temperatura de un cultivo de células, éstas responden metabólicamente. La respuesta inicial de "urgencia" está mediada por enzimas capaces de "remodelar" las membranas y hacer la célula más resistente al frío. Esta remodelación se lleva a cabo por desaturación de enlaces simples en las cadenas lípidas acilo para formar dobles enlaces y reordenamiento (barajeo) de cadenas en las diferentes moléculas para formar fosfolípidos con dos ácidos grasos insaturados. El reordenamiento se lleva a cabo mediante fosfolipasas, que desdoblan al ácido graso del esqueleto glicerol, y aciltransferasas, que los transfieren a fosfolípidos diferentes. Ade-

más, las células cambian el tipo de fosfolípidos que sintetizan en favor de otros que contengan más ácidos grasos insaturados. Como consecuencia de la actividad de estas diferentes enzimas, las propiedades físicas de una membrana celular coinciden con las condiciones prevalecientes en su entorno. En diversos organismos se ha demostrado la conservación de fluidez de las membranas mediante ajustes en la composición de las grasas acilo, incluyendo mamíferos en estado de hibernación, peces que viven en estanques y cuya temperatura corporal cambia notablemente del día a la noche, plantas resistentes al frío y bacterias que viven en aguas termales.

Para comprobar que la insaturación de los ácidos grasos contribuye a la tolerancia de bajas temperaturas, se han efectuado experimentos empleando cianobacterias incapaces de efectuar ciertos tipos de desaturación. Cuando se compara la velocidad de crecimiento de cepas nativas y de las mutantes a 34°C, se observa poca diferencia, pero cuando la temperatura desciende a 22°C, el tiempo de duplicación de las células mutantes se eleva hasta 59 horas en comparación con el tiempo de duplicación de las cepas nativas, que es de 22 horas. Si experimentalmente se introduce en las células mutantes el gen que codifica la enzima (*desA*), se restablece la tolerancia al frío.

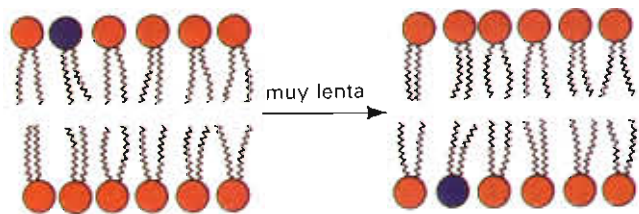
Asimetría de los lípidos de la membrana

La bicapa de lípidos consta de dos hojas distintas y no hay razón para suponer que la composición de los lípidos en ambas mitades deba ser idéntica. De hecho, hay numerosas pruebas que indican que los lípidos de la membrana plasmática se distribuyen en un patrón muy asimétrico. Una serie de experimentos que han conducido a esta conclusión tiene la ventaja de que las enzimas que digieren lípidos no penetran la membrana plasmática y, por consiguiente, sólo digieren los lípidos que residen en la hoja externa de la bicapa. Si se somete un eritrocito humano a la acción de una fosfolipasa que hidroliza fosfoglicéridos, casi 70% de la fosfatidilcolina de la membrana se libera en el medio, pero sólo se libera 20% de la fosfatidiletanolamina de la membrana y menos de 10% de la fosfatidilserina de dicha

membrana. Estos datos indican que, en comparación con la hoja interna, la capa externa posee una concentración desproporcionadamente alta de fosfatidilcolina (y de esfingomielina) y una baja concentración de fosfatidiletanolamina y de fosfatidilserina (fig. 4-22). De esto se deduce que la bicapa de lípidos puede imaginarse como estructura compuesta de dos monocapas independientes, más o menos estables, con diferentes propiedades físicas y químicas.

Dada la asimetría de los fosfolípidos, surge la pregunta: ¿hasta qué grado hay intercambio de fosfolípidos a través de la bicapa? Mediciones de diferente tipo con fosfolípidos marcados indican que la vida media de una molécula de fosfolípido que permanece fija dentro de una capa, en oposición a la que se mueve a través de la otra capa, se mide en horas o días. En contraste, un fosfolípido puede desplazarse lateralmente dentro de la misma capa con bastante facilidad. Se estima que un fosfolípido puede difundir de un extremo al otro de una bacteria en uno o dos segundos. Por lo tanto, de todos los posibles movimientos que puede efectuar un fosfolípido, el paso desde un lado al otro de la membrana (flip-flop) es el más restringido (fig. 4-23). Este dato no es sorprendente, pues para que eso ocurra, el grupo de la cabeza hidrófila del lípido tendría que pasar a través de la capa hidrófoba interna de la membrana, lo cual es termodinámicamente desfavorable. Sin embargo, hay células que contienen enzimas, llamadas *flipasas*, que mueven activamente ciertos fosfolípidos desde una capa de la membrana a la otra. Estas enzimas pueden participar en el establecimiento de la asimetría de los lípidos y también revertir la velocidad de los lentos movimientos pasivos que ocurren a través de la membrana.

(a) Difusión transversa (flip-flop)



(b) Difusión lateral

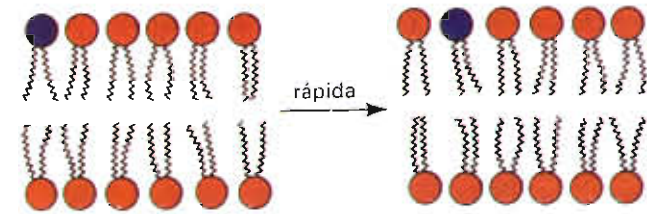


FIGURA 4-23 Movimientos posibles de los fosfolípidos en una membrana. *a)* El movimiento de un fosfolípido de una capa de la membrana a la otra (denominado “flip-flop”) ocurre a una velocidad muy lenta debido a que es necesario desplazar el grupo polar de la cabeza a través de los ácidos grasos situados en el centro de la bicapa. *b)* Dentro de una capa los fosfolípidos pueden difundir lateralmente con rapidez.

4-4 Naturaleza dinámica de la membrana plasmática

A partir del análisis previo se deduce que la bicapa de lípidos puede existir en un estado relativamente fluido. La movilidad de las moléculas individuales de lípidos dentro de la bicapa de la membrana plasmática puede observarse directamente uniéndose partículas doradas a las cabezas polares de los lípidos y siguiendo el movimiento de dichas partículas con el microscopio (fig. 4-24). Puesto que los lípidos constituyen la matriz en la cual están embebidas las proteínas integrales de las membranas, el estado físico de estos lípidos también es un importante factor determinante de la movilidad de dichas proteínas integrales. La demostración de que las proteínas integrales pueden moverse dentro de la membrana plasmática fue una de las piedras angulares para formular el modelo de mosaico fluido. Las propiedades dinámicas de las proteínas de la membrana se revelan de diferentes maneras.

Difusión de las proteínas de la membrana luego de la fusión celular

La **fusión celular** es una técnica para unir dos células de diferente tipo o células de dos especies distintas y producir una célula con un citoplasma común y una sola membrana plasmática continua. La fusión se logra haciendo “pegajosa” la superficie externa de las células, de modo que sus membranas plasmáticas se adhieran entre sí. La fusión celular se puede inducir añadiendo ciertos virus inactivados

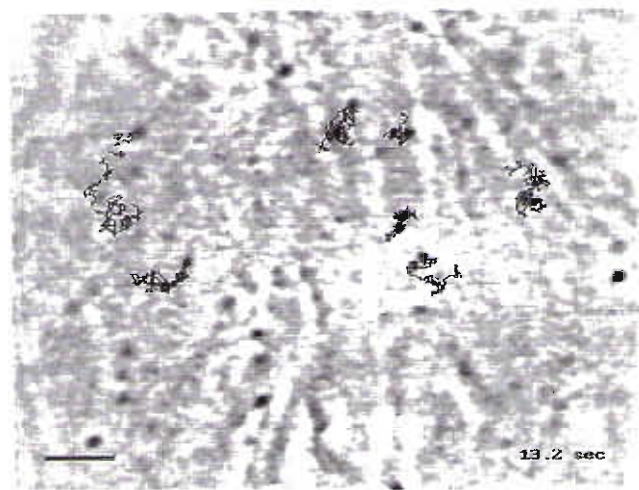


FIGURA 4-24 Determinación experimental de la movilidad de los fosfolípidos dentro de la bicapa de lípidos de la membrana plasmática. Un pequeño número de fosfolípidos de la capa externa de la membrana plasmática de un fibroblasto viviente fueron marcados con partículas de oro y sus movimientos se siguieron bajo microscopio en una pantalla de video. Pudo demostrarse que los lípidos marcados se mueven al azar dentro de la membrana según lo indican los rastros trazados sobre la superficie de la célula. La barra representa 3 μm . (Según Greta, M. Lee y cols.: J. Cell Biol. 120:28, 1993; con permiso de Rockefeller University Press.)

que se unen a la superficie de la membrana o agregando el compuesto polietilenoglicol. La fusión de las células ha desempeñado un importante papel en biología celular y en la actualidad es parte de la técnica para preparar anticuerpos específicos (sección 17-13).

En los primeros experimentos para demostrar que las proteínas de la membrana tenían capacidad de movimiento en el plano de la membrana se empleó la fusión celular, y fueron publicados en 1970 por L.D. Frye y Michael Edidin, de la Universidad Johns Hopkins. En estos experimentos se fusionaron células de ratón y de humanos, y luego se observó la localización de proteínas específicas de la membrana plasmática una vez que las dos membranas se volvieron continuas. Para seguir la distribución de las proteínas de la membrana, de ratón o humanas, en diferentes momentos después de la fusión se prepararon anticuerpos contra uno u otro tipo de proteínas y se unieron mediante enlaces covalentes a colorantes fluorescentes. Los anticuerpos contra proteínas de ratón formaron complejos con un colorante que produce fluorescencia verde y los anticuerpos contra proteínas humanas con uno que produce fluorescencia roja. Cuando se añadieron los anticuerpos a las células fusiona-

das se enlazaron a las proteínas humanas o de ratón y pudo determinarse su localización bajo microscopio de fluorescencia (fig. 4-25, *a*). En el momento de la fusión, la membrana plasmática podía considerarse mitad humana y mitad ratón; o sea, las dos proteínas permanecieron separadas en su propio hemisferio (paso 3, fig. 4-25, *a,b*). Después de la fusión, conforme transcurrió el tiempo, se observó que las proteínas de la membrana se desplazan lateralmente dentro de la misma hacia el hemisferio opuesto. Unos 40 minutos después, las proteínas de cada especie estaban distribuidas uniformemente alrededor de toda la membrana celular híbrida (paso 4, fig. 4-25, *a*). Cuando se efectúa el mismo experimento a temperatura más baja, la viscosidad de la bicapa de lípidos aumenta y la movilidad de las proteínas de la membrana disminuye (fig. 4-25, *c*).

Restricciones a la movilidad de las proteínas

La fusión celular mostró por primera vez las características dinámicas de las proteínas integradas a la membrana, pero hay otras técnicas más adecuadas para medir la extensión y velocidad de los movimientos de las proteínas. Las técnicas

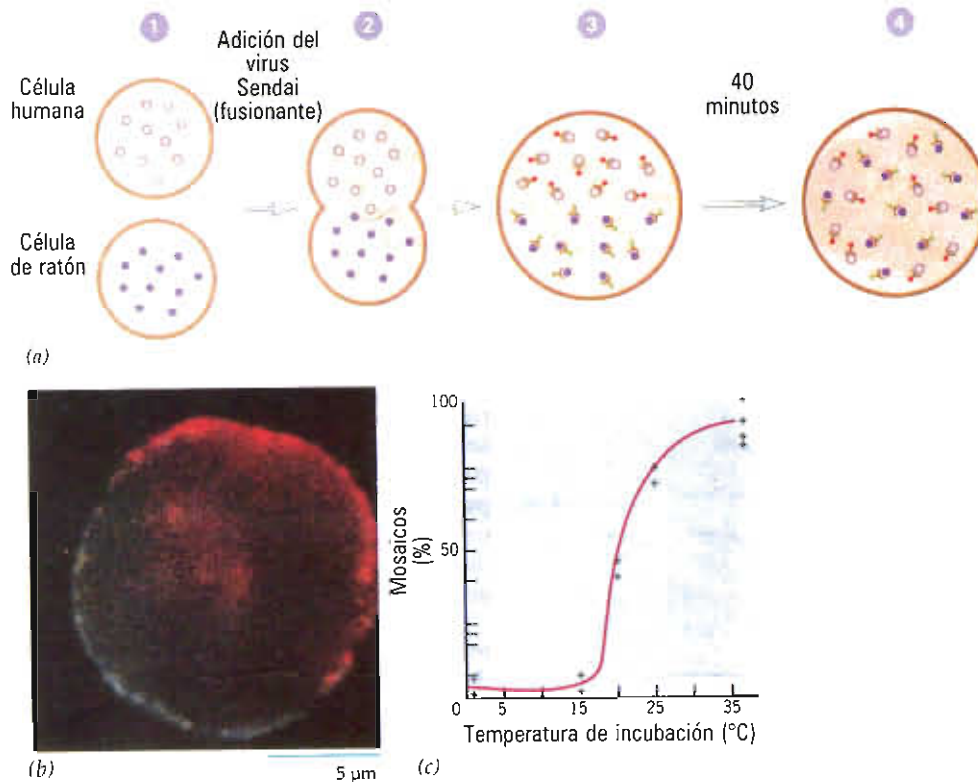


FIGURA 4-25. Con ayuda de la fusión celular se puede demostrar la movilidad de las proteínas de la membrana. *a*) Diseño de un experimento en el cual se fusionaron células humanas y de ratón (pasos 1-2); posteriormente se siguió la distribución de las proteínas de cada célula durante cierto tiempo en los híbridos (pasos 3-4). Las proteínas de la membrana de ratón se indican con círculos sólidos, las proteínas de la membrana humana en círculos abiertos. En los híbridos, las proteínas humanas y de ratón se localizaron por su interacción con anticuerpos fluorescentes rojos y verdes, respectivamente. *b*) Micrografía que muestra una célula fusionada en la cual las proteínas de ratón y humanas aún se encuentran en sus respectivos hemisferios (equivalente al híbrido de la parte *a*, paso 3). *c*) El efecto de temperatura sobre la difusión de las proteínas de la membrana pudo observarse examinando el porcentaje de células donde aparecen mezcladas las proteínas de las dos especies (que forman un mosaico) 40 minutos después de la fusión. El porcentaje de células mosaico se incrementa de manera brusca cuando la temperatura se eleva a más de 15°C, lo que sugiere que los lípidos sufren una fase de transición durante la cual pasan del estado de gel al estado líquido. (*b,c*: Según L.D. Frye y Michael Edidin, *J. Cell Sci.* 328:334, 1970; con permiso de The Company of Biologists Ltd.)

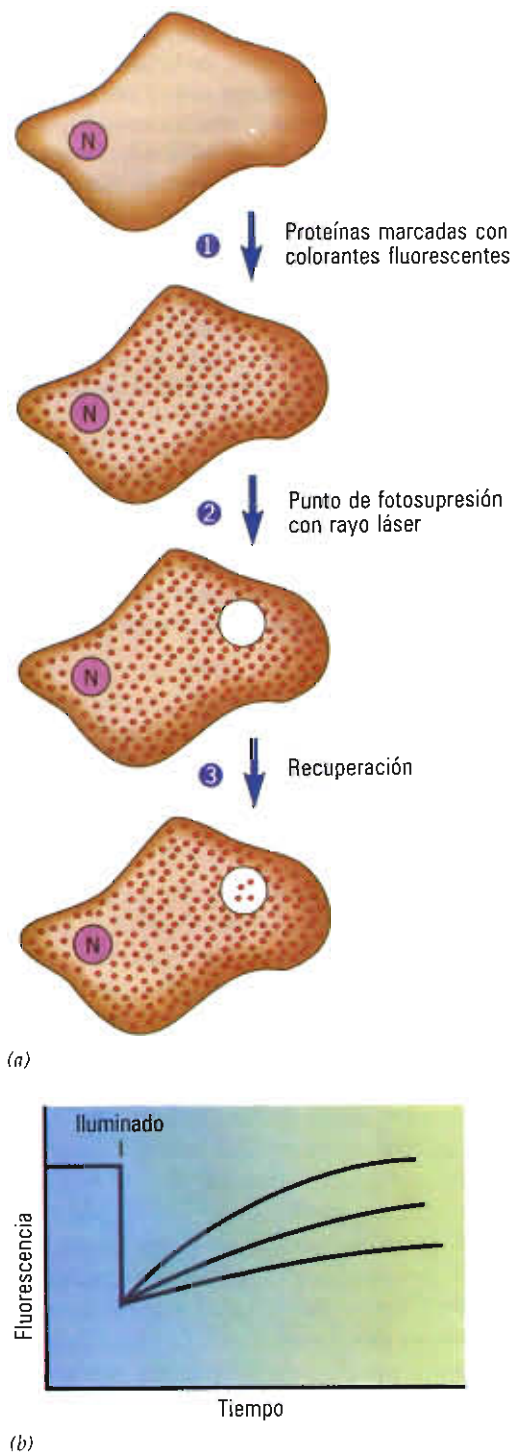


FIGURA 4-26. Medición de la velocidad de difusión de las proteínas de membrana por recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueamiento (RFDF). *a*) En esta técnica se marca un componente particular de la membrana con un colorante fluorescente (paso 1). A continuación se irradia una pequeña región de la superficie para blanquear las moléculas del colorante (paso 2) y se mide el tiempo para recuperar la fluorescencia en la región blanqueada (paso 3). *b*) La velocidad de recuperación de la fluorescencia dentro del punto iluminado puede variar dependiendo de la(s) proteína(s). Esta velocidad de recuperación se relaciona con el coeficiente de difusión de la especie fluorescente.

empleadas comúnmente son *recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueamiento* (RFDF) y *seguimiento de partícula única* (SPT). En la técnica RFDF (fig. 4-26 *a*), primero se marcan los componentes de la membrana uniéndolos a un colorante fluorescente. Las proteínas de la membrana pueden marcarse de manera indiscriminada tratando la célula con un colorante inespecífico (p. ej., isotiocianato de fluoresceína) que reacciona con todas las moléculas de proteína expuestas, o alternativamente se puede marcar una proteína particular de la membrana empleando sondas específicas, como anticuerpos fluorescentes. Una vez marcadas, las células se colocan bajo el microscopio y se irradian individualmente empleando un delgado rayo láser enfocado con gran precisión, el cual blanquea de manera irreversible las moléculas fluorescentes que encuentra en su camino y deja un punto circular (típicamente de $1\ \mu\text{m}$ de diámetro) sobre la superficie de la célula desprovista de fluorescencia. Si las proteínas marcadas en la membrana son móviles, entonces los movimientos al azar de estas moléculas provocan la reaparición gradual de la fluorescencia en el círculo radiado. La velocidad de recuperación de la fluorescencia (fig. 4-26, *b*) suministra una medida directa de la velocidad de difusión (expresada como coeficiente de difusión) de las moléculas móviles. El grado de recuperación de la fluorescencia (expresado como porcentaje de la intensidad original) proporciona una medida del porcentaje de moléculas marcadas libres de difundir.

La técnica de recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueamiento tiene sus inconvenientes. Se emplea para seguir el movimiento de una extensa población de moléculas marcadas conforme difunden a través de una distancia relativamente grande. Por consiguiente, esta técnica no puede suministrar información acerca del trayecto que siguen las proteínas individuales, ni tampoco si una molécula se mueve en una región restringida (o dominio) dentro de la membrana, pero no sobre una distancia lo bastante grande para entrar al círculo radiado y ser registrada como móvil. Para superar estas limitaciones se han desarrollado técnicas para seguir una sola partícula, en las cuales se marcan proteínas de la membrana con sustancias como partículas de oro coloidal (diámetro de 15 a 40 nm), que pueden observarse y seguir individualmente bajo microscopio, de la misma manera que las moléculas individuales de lípidos se pudieron seguir en el experimento mostrado en la figura 4-24.

La rapidez de difusión de las proteínas dentro de una membrana depende de varios factores, incluyendo viscosidad de la matriz lipídica a través de la cual debe desplazarse la proteína: cuanto más fluida la bicapa, mayor la movilidad. Otro factor es la masa de la proteína: a mayor peso molecular de la partícula menor será la velocidad de difusión.

Si la movilidad de la proteína dependiera estrictamente de estos parámetros físicos: viscosidad del lípido y tamaño de la partícula, podría esperarse que las proteínas se desplazaran con coeficientes de difusión cercanos a $10^{-9}\ \text{cm}^2/\text{segundo}$ (en comparación con casi $10^{-8}\ \text{cm}^2/\text{segundo}$ para las moléculas de lípidos más pequeñas y más móviles de la bicapa). Sin embargo, cuando se estudian los movimientos de las proteínas en una membrana natural median-

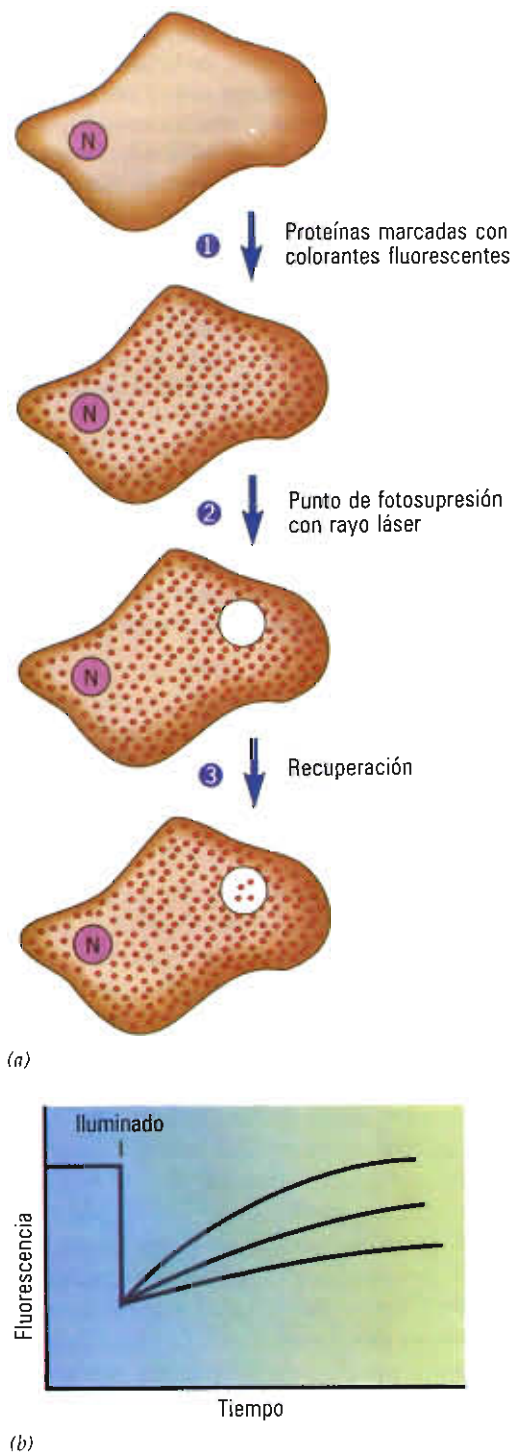


FIGURA 4-26. Medición de la velocidad de difusión de las proteínas de membrana por recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueamiento (RFDF). *a*) En esta técnica se marca un componente particular de la membrana con un colorante fluorescente (paso 1). A continuación se irradia una pequeña región de la superficie para blanquear las moléculas del colorante (paso 2) y se mide el tiempo para recuperar la fluorescencia en la región blanqueada (paso 3). *b*) La velocidad de recuperación de la fluorescencia dentro del punto iluminado puede variar dependiendo de la(s) proteína(s). Esta velocidad de recuperación se relaciona con el coeficiente de difusión de la especie fluorescente.

empleadas comúnmente son *recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueamiento* (RFDF) y *seguimiento de partícula única* (SPT). En la técnica RFDF (fig. 4-26 *a*), primero se marcan los componentes de la membrana uniéndolos a un colorante fluorescente. Las proteínas de la membrana pueden marcarse de manera indiscriminada tratando la célula con un colorante inespecífico (p. ej., isotiocianato de fluoresceína) que reacciona con todas las moléculas de proteína expuestas, o alternativamente se puede marcar una proteína particular de la membrana empleando sondas específicas, como anticuerpos fluorescentes. Una vez marcadas, las células se colocan bajo el microscopio y se irradian individualmente empleando un delgado rayo láser enfocado con gran precisión, el cual blanquea de manera irreversible las moléculas fluorescentes que encuentra en su camino y deja un punto circular (típicamente de $1\ \mu\text{m}$ de diámetro) sobre la superficie de la célula desprovista de fluorescencia. Si las proteínas marcadas en la membrana son móviles, entonces los movimientos al azar de estas moléculas provocan la reaparición gradual de la fluorescencia en el círculo radiado. La velocidad de recuperación de la fluorescencia (fig. 4-26, *b*) suministra una medida directa de la velocidad de difusión (expresada como coeficiente de difusión) de las moléculas móviles. El grado de recuperación de la fluorescencia (expresado como porcentaje de la intensidad original) proporciona una medida del porcentaje de moléculas marcadas libres de difundir.

La técnica de recuperación de la fluorescencia después de fotoblanqueamiento tiene sus inconvenientes. Se emplea para seguir el movimiento de una extensa población de moléculas marcadas conforme difunden a través de una distancia relativamente grande. Por consiguiente, esta técnica no puede suministrar información acerca del trayecto que siguen las proteínas individuales, ni tampoco si una molécula se mueve en una región restringida (o dominio) dentro de la membrana, pero no sobre una distancia lo bastante grande para entrar al círculo radiado y ser registrada como móvil. Para superar estas limitaciones se han desarrollado técnicas para seguir una sola partícula, en las cuales se marcan proteínas de la membrana con sustancias como partículas de oro coloidal (diámetro de 15 a 40 nm), que pueden observarse y seguir individualmente bajo microscopio, de la misma manera que las moléculas individuales de lípidos se pudieron seguir en el experimento mostrado en la figura 4-24.

La rapidez de difusión de las proteínas dentro de una membrana depende de varios factores, incluyendo viscosidad de la matriz lipídica a través de la cual debe desplazarse la proteína: cuanto más fluida la bicapa, mayor la movilidad. Otro factor es la masa de la proteína: a mayor peso molecular de la partícula menor será la velocidad de difusión.

Si la movilidad de la proteína dependiera estrictamente de estos parámetros físicos: viscosidad del lípido y tamaño de la partícula, podría esperarse que las proteínas se desplazaran con coeficientes de difusión cercanos a $10^{-9}\ \text{cm}^2/\text{segundo}$ (en comparación con casi $10^{-8}\ \text{cm}^2/\text{segundo}$ para las moléculas de lípidos más pequeñas y más móviles de la bicapa). Sin embargo, cuando se estudian los movimientos de las proteínas en una membrana natural median-

te técnicas RFDF y otras, de ordinario se observa que se mueven con mayor lentitud que la pronosticada antes. Los coeficientes de difusión típicos para las proteínas de la membrana varían de 10^{-10} a 10^{-12} cm²/segundo, según la especie de proteína y la membrana. En realidad, cierto porcentaje de las moléculas de la proteína parecen estar completamente inmóviles e incapaces de difusión alguna.

Control de la motilidad de la membrana

Es evidente que las proteínas de la membrana no son totalmente libres para moverse al azar en el "mar" lípido, sino que están sujetas a influencias restrictivas que inhiben su movilidad. Algo de la restricción puede ser resultado de interacciones en la propia membrana. Por ejemplo, muchas proteínas integrales existen como complejos oligoméricos (como el centro de reacciones de fotosíntesis mostrado en la página 115) cuyo peso molecular puede ser muy grande, y en consecuencia su coeficiente de difusión pequeño. Otras veces, las proteínas integrales se unen a materiales presentes en la superficie interna o la externa de la membrana. Como se analizará después, las membranas plasmáticas de muchas células poseen una cadena fibrilar o "esqueleto" de proteínas periféricas situado en su superficie interna. Cierta proporción de las proteínas integrales de la membrana parece estar fija e inmovilizada en el esqueleto de la membrana (fig. 4-31). Aun si las proteínas integrales no estuviesen firmemente ancladas, las proteínas periféricas de la membrana pueden formar vallas alrededor de ciertas partes de la membrana y establecer dominios que restringen la distancia que puede recorrer una proteína (fig. 4-27). Al seguir la movilidad de proteínas individuales se observa la presencia de estas barreras. Los dominios de membrana pueden mantener combinaciones específicas de proteínas en estrecha proximidad, lo suficiente para facilitar su interacción.

La movilidad de las proteínas integrales también puede ser restringida por materiales presentes en la superficie externa de la membrana (fig. 4-28). Esto se demuestra con mayor claridad en experimentos con células que poseen genes que codifican proteínas de membrana alteradas. Por ejemplo, si mediante manipulaciones se introduce a la célula un gen que codifica un polipéptido transmembrana que carece de la porción que normalmente se proyecta fuera de la membrana, la velocidad de difusión lateral de la proteína mutante puede ser mucho mayor que su contraparte normal. Este resultado sugiere que el movimiento de una proteína transmembrana a través de la bicapa puede ser más lento por la presencia de materiales extracelulares que se enredan en la porción más externa de la proteína.

Dominios de membrana y polaridad celular

Incluso entre membranas que se caracterizan por difusión lateral extensa, hay muchos ejemplos en los cuales se mantiene una organización o disposición particular de las proteínas de membrana. Las diferencias topográficas son particularmente evidentes en células de tejidos organizados, donde las diferentes superficies celulares tienen funciones distintas. Por ejemplo, las células epiteliales que revisten la pared intestinal o constituyen los microscópicos túbulos del riñón son células muy polarizadas cuyas diferentes superficies efectúan distintas funciones (fig. 4-29). Como resulta-

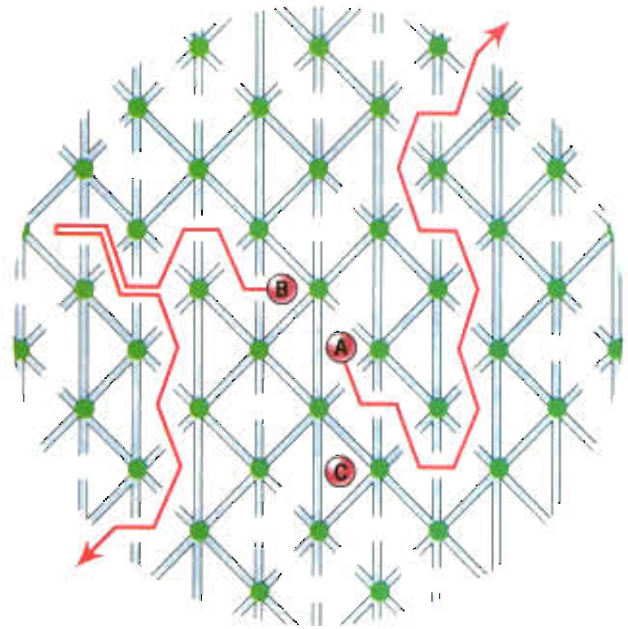


FIGURA 4-27. Restricción al movimiento de las proteínas de membrana por las proteínas periféricas internas. La membrana plasmática de la célula a menudo contiene un esqueleto en su parte interna que puede restringir el movimiento de una proteína integral. La membrana plasmática del eritrocito aquí mostrada contiene una disposición de moléculas fibrosas de espectrina (véase figura 4-31, d) que puede actuar como valla para restringir el movimiento de las proteínas. En este dibujo, las tres proteínas (mostradas como círculos y trazos rojos) deben encontrar grietas en la red del esqueleto para desplazarse unos pocos cientos de nanómetros. (Según M. Edidin, Trends Cell Biol. 2:378, 1992.)

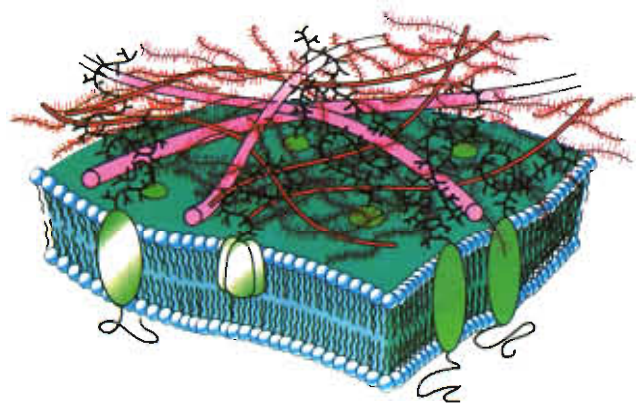


FIGURA 4-28. Restricción al movimiento de las proteínas de membrana por materiales extracelulares. La superficie externa de la membrana plasmática contiene varias glucoproteínas y polisacáridos extracelulares que pueden impedir el movimiento de las proteínas integrales de la membrana al enredarse en el dominio extracelular de la proteína.

Membrana plasmática apical

- regulación de la captación de nutrientes y agua
- secreción regulada
- protección

Membrana plasmática lateral

- contacto y adherencia de la célula
- comunicación celular

Membrana basal

- contacto de la célula con el sustrato
- generación de gradientes iónicos

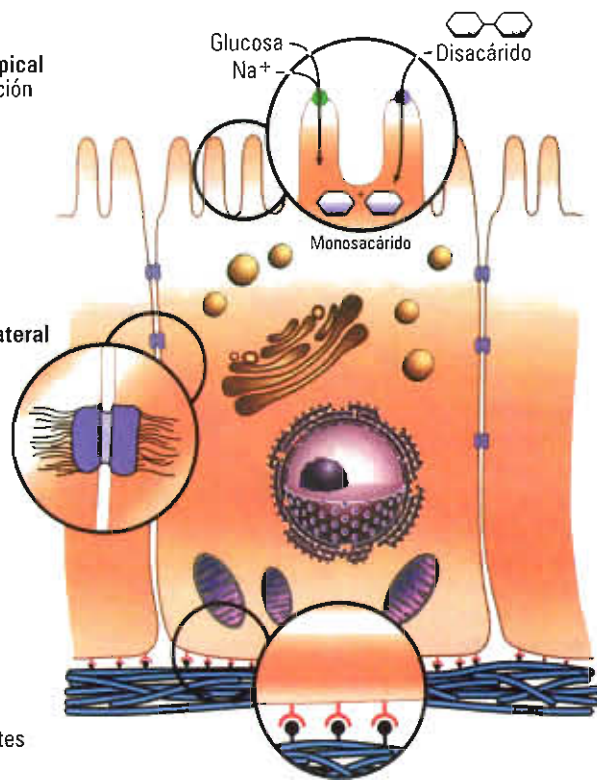


FIGURA 4-29. Diferentes funciones de la membrana plasmática de una célula epitelial. *a)* La superficie apical de esta célula epitelial del intestino contiene proteínas integrales cuya función se relaciona con transporte de iones e hidrólisis de disacáridos, como sacarosa y lactosa; la superficie lateral contiene proteínas integrales funcionalmente relacionadas con interacciones entre las células; y la superficie basal contiene proteínas integrales que participan en la unión de la célula con la membrana basal subyacente. *b)* Micrografía electrónica que muestra la localización de las enzimas que separan sacarosa (invertina) en las microvellosidades de la célula epitelial intestinal. La localización de la enzima se manifiesta por la presencia de anticuerpos marcados dirigidos contra la misma. (*b*: Cortesía de J.A.M. Fransen y cols. J. Cell Biol. 115:50, 1991; con permiso de Rockefeller University Press.)

(a)



(b)

0.5 μm

entre las sinapsis (fig. 4-49) y los receptores para lipoproteínas de baja densidad se concentran en placas de la membrana plasmática especializada para facilitar su penetración al interior (véase sección 8-7).

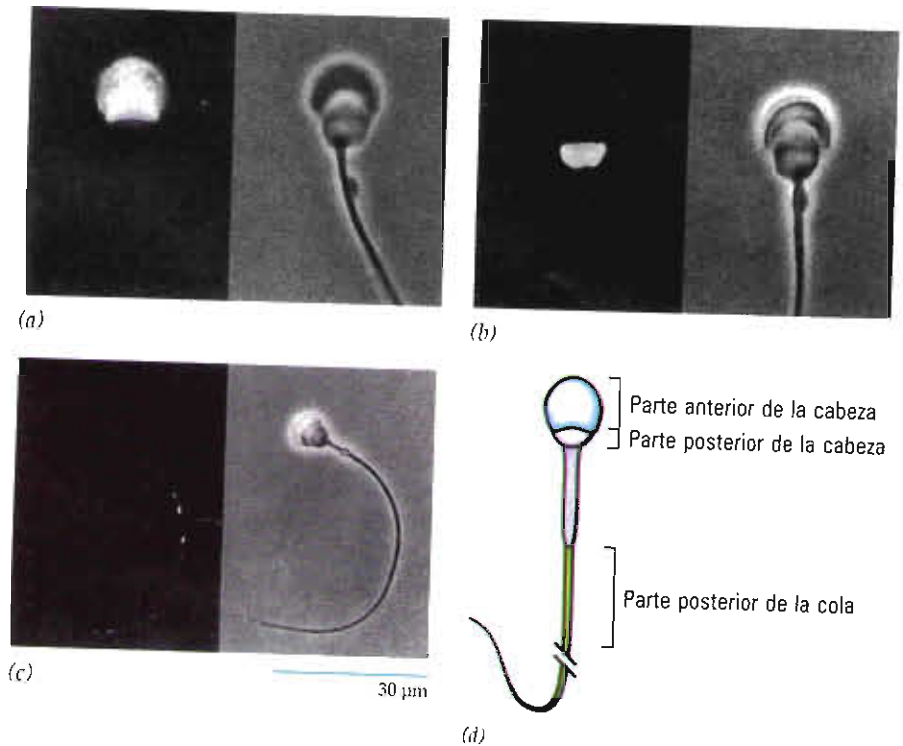
De los diferentes tipos de células de mamífero, los espermatozoides tienen la estructura más altamente diferenciada. Un espermatozoide maduro se puede dividir en cabeza, cuerpo o pieza central y cola, cada uno con su propia función especializada. Aunque dividido en varias partes distintas, el espermatozoide está cubierto por una membrana plasmática *continua* que, según han revelado numerosas técnicas, consta de un mosaico de diferentes tipos de dominios localizados. Por ejemplo, cuando el espermatozoide es tratado con varios anticuerpos específicos, cada anticuerpo se combina con la superficie de la célula en un patrón topográfico único que refleja la distribución única del antígeno particular en la membrana plasmática (fig. 4-30).

Membrana plasmática de los eritrocitos

De todos los diferentes tipos de membrana, la membrana plasmática del eritrocito humano (glóbulo rojo) es la más estudiada y mejor comprendida (fig. 4-31, *a*). Hay varias razones para la popularidad de esta membrana. Las células son poco costosas y rápidamente disponibles en cantidades enormes a partir de sangre completa. Ya se encuentran aisladas como células únicas y no es necesario disociarlas de un tejido complejo. Las células son extremadamente simples en comparación con otros tipos de ellas, carecen por completo de membranas nuclear y citoplásmica, que inevi-

nas o de la superficie basal que se adhiere a un sustrato extracelular subyacente (*membrana basal*) y cuya función es intercambiar sustancias con el torrente sanguíneo. En otros ejemplos, los receptores para neurotransmisores se concentran en regiones de la membrana plasmática localizadas

FIGURA 4-30. Diferenciación de la membrana plasmática del espermatozoide de mamífero según puede observarse con la técnica de anticuerpos fluorescentes. *a-c*) Tres pares de fotografías, cada una mostrando la distribución de un antígeno particular en la superficie de la célula revelada por el enlace a un anticuerpo fluorescente. Los tres antígenos se localizan en diferentes porciones de la membrana del espermatozoide. Cada par de fotografías muestra el patrón de fluorescencia del anticuerpo enlazado y una micrografía de la misma célula con contraste de fases. *d*) Diagrama que resume la distribución de antígenos. (*a-c*: Según Diana Gold Myles, Paul Primakoff y Anthony R. Bellvé, *Cell* 23:434, 1981; con permiso de Cell Press.)



tablemente contaminan las membranas plasmáticas preparadas a partir de otras células. Además, se puede obtener la membrana plasmática purificada *intacta* del eritrocito colocando simplemente las células en solución salina diluida (hipotónica). Las células responden a este choque osmótico captando agua e hinchándose, fenómeno denominado *hemólisis*. Conforme aumenta la superficie celular, su contenido, compuesto casi en su totalidad por hemoglobina disuelta, fluye hacia afuera de la célula y deja un "fantasma" de la membrana plasmática intacta (fig. 4-31, b).

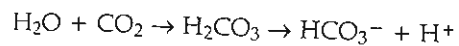
Una vez aislada la membrana plasmática del eritrocito se pueden solubilizar y separar (fraccionar) las proteínas para tener una mejor idea de su diversidad dentro de la membrana. El fraccionamiento de las proteínas de membrana se efectúa mejor empleando electroforesis en gel de poliácridamida en presencia del detergente iónico dodecilsulfato de sodio (DSS). (En la sección 17-7 se estudia la técnica DSS-EGPA.) El DSS mantiene soluble la proteína integral y además añade gran número de cargas negativas a las proteínas con las que se une. Aunque el número de moléculas DSS por unidad de peso de proteína tiende a ser relativamente constante, las moléculas se separan según su propio peso molecular. Las proteínas de mayor tamaño se desplazan más lentamente a través del tamiz molecular del gel. Cuando se aplica la técnica DSS-EGPA, las principales proteínas de la membrana del eritrocito se separan en casi una docena de bandas (fig. 4-31, c).

Un examen más detenido de la membrana plasmática del eritrocito ilustrará los tipos de funciones que pueden desempeñar estas proteínas. Entre ellas se encuentran varias enzimas (incluyendo gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, una enzima necesaria para producir energía duran-

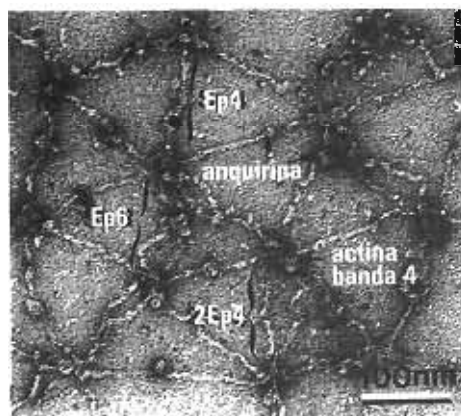
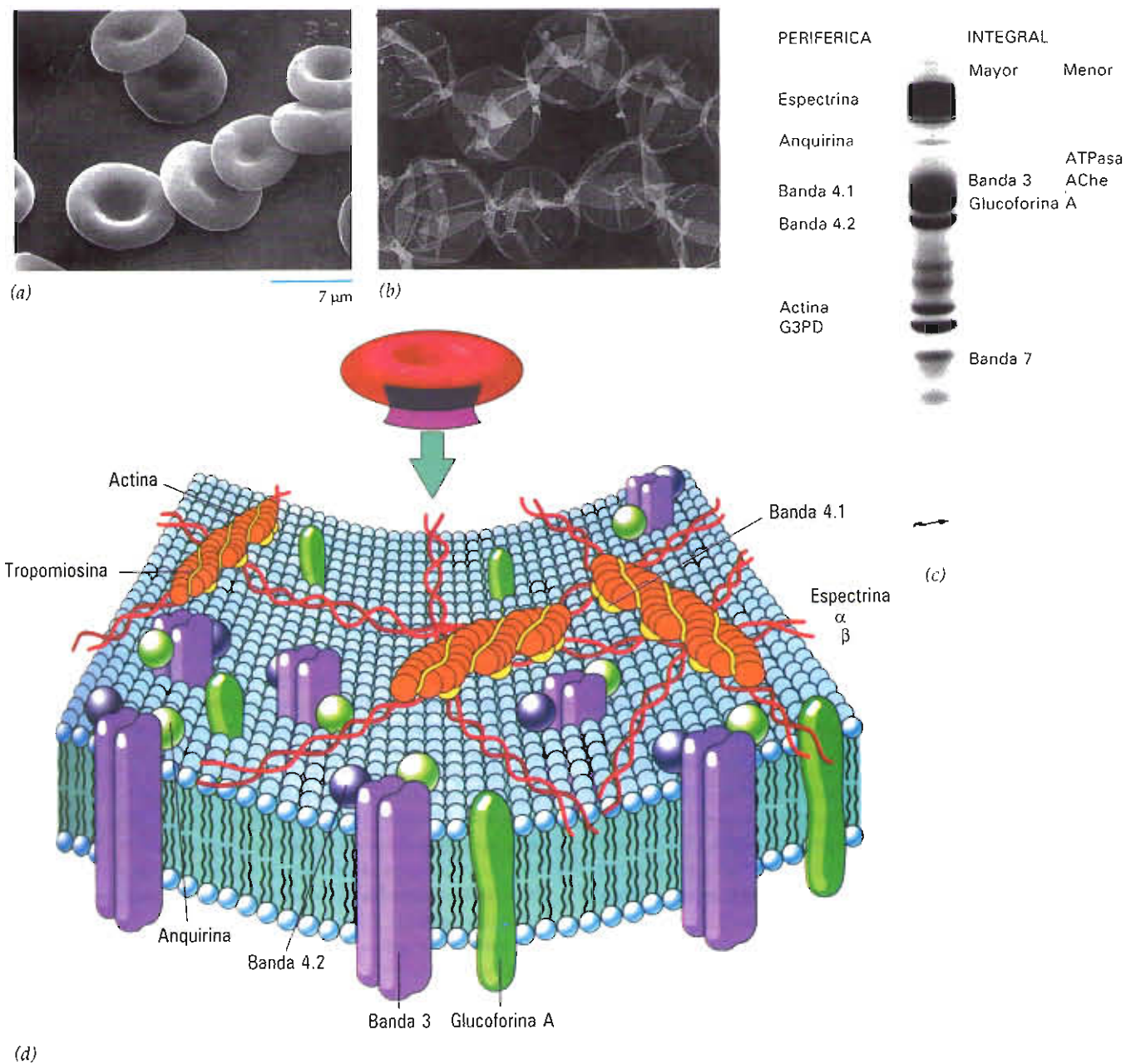
te la glucólisis), proteínas de transporte (para iones, aminoácidos y azúcares) y proteínas esqueléticas (p. ej., espectrina). Las diferentes proteínas de la membrana plasmática del eritrocito se pueden correlacionar con el papel de estas células en el transporte de oxígeno y de dióxido de carbono y con la resistencia física que estas células encuentran durante su circulación a través del cuerpo.

Proteínas integrales de la membrana del eritrocito

En la figura 4-31, *d*, se muestra un modelo de membrana plasmática del eritrocito y sus principales proteínas. La membrana contiene dos proteínas integrales principales; ambas son proteínas que rodean a la membrana y que contienen carbohidratos, denominadas banda 3 y glucoforina A. La banda 3, que ocurre como dímero compuesto de dos subunidades idénticas, rodea a la membrana cuando menos una docena de veces y contiene una cantidad relativamente pequeña de carbohidratos (6 a 8% del peso de la molécula). La banda 3 desempeña una función en el movimiento de aniones. Conforme la sangre circula a través de los tejidos, el dióxido de carbono se disuelve en el líquido del torrente sanguíneo (plasma) y luego se disocia según la reacción



Los iones bicarbonato (HCO_3^-) penetran a los eritrocitos intercambiándose por iones cloro, los cuales salen de la célula. En los pulmones, donde se libera dióxido de carbono, ocurre la reacción inversa y los iones bicarbonato abandonan el eritrocito intercambiándose por iones cloro. El movimiento recíproco de HCO_3^- y Cl^- ocurre a través de un canal situado en el centro de cada dímero de la banda 3.



(e)

FIGURA 4-31. Membrana plasmática del eritrocito humano. *a)* Gammaografía electrónica de eritrocitos humanos. *b)* Micrografía de la membrana plasmática de fantasmas de eritrocitos que fueron aislados al permitir que el eritrocito se hinchara y sufriera hemólisis, según se describe en el texto. *c)* Resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (EGPA-DSS) empleada para fraccionar proteínas de la membrana eritrocítica, identificadas en el lado correspondiente al gel. El gel se tiñó con azul Coomassie para proteínas. *d)* Modelo de membrana plasmática del eritrocito vista desde la superficie interna que muestra las proteínas integrales embebidas en la bicapa de lípidos y la disposición de las proteínas periféricas que constituyen el esqueleto interno de la membrana. *e)* Micrografía electrónica que muestra la disposición de las proteínas del esqueleto interno de la membrana (Ep = espectrina). (*a*: Según Francois M.M. Morel, Richard F. Baker y Harold Wayland, J. Cell Biol. 48:91, 1971; *b*: cortesía de Joseph F. Hoffman; *c*: reproducida, con permiso, de V.T. Marchesi, H. Furlimayr y M. Tomita, Ann. Rev. Biochem., vol. 45, © 1976 por Annual Reviews Inc; *e*: según Shih-Chun Liu, Laura H. Derick y Jiri Palck, J. Cell Biol. 104:527, 1987; con permiso de Rockefeller University Press.)

La glucoforina A fue la primera proteína de membrana en la que se determinó la secuencia de aminoácidos. En la figura 4-16 se presenta la disposición de la cadena de polipéptidos de la glucoforina A en la membrana plasmática. (También se presentan otras tres glucoforinas relacionadas, B, C y D, presentes en la membrana en concentración mucho menor.) A diferencia de la banda 3, la glucoforina A rodea la membrana sólo una vez y contiene una porción muy amplia de carbohidrato que consta de 16 cadenas de oligosacáridos que en conjunto constituyen casi 60% del peso de la molécula. Se cree que la función primaria de las glucoforinas se deriva del gran número de cargas negativas que se originan en los extremos de sus cadenas de carbohidratos. Debido a estas cargas, los eritrocitos se repelen entre sí, evitando la formación de grumos conforme los eritrocitos circulan a través de los vasos de menor calibre. Es digno de mencionar que las personas que carecen de las glucoforinas A y B en sus eritrocitos no muestran efectos patológicos por su ausencia, pero las proteínas de la banda 3 están más intensamente glucosiladas, lo que al parecer compensa la ausencia de cargas negativas necesarias para evitar la interacción de célula a célula.

El esqueleto de la membrana del eritrocito

Las proteínas periféricas de la membrana del eritrocito se localizan en su superficie interna y constituyen el esqueleto fibrilar de la membrana (fig. 4-31, *d,e*) que actúa para mantener la forma del eritrocito y restringir el movimiento de las proteínas integrales de la membrana. El principal componente del esqueleto es la *espectrina*, una proteína fibrosa flexible de casi 100 nm de longitud compuesta de dos subunidades: una α y una β enrolladas una sobre la otra. En su estado nativo dentro de la membrana, dos moléculas (cuatro subunidades) de espectrina se encuentran enlazadas cabeza con cabeza para formar un filamento de 200 nm. La espectrina se fija a la superficie interna de la membrana por medio de enlaces no covalentes a otra proteína periférica, la *anquirina* (esferas verdes de la figura 4-31, *d*), que a su vez se une por enlaces no covalentes a la porción citoplásmica de una molécula de la banda 3. Las porciones correspondientes a la cola de las moléculas de espectrina se unen entre sí en disposición pentagonal o hexagonal mediante una batería de proteínas, incluyendo las proteínas actina y tropomiosina, que en condiciones típicas participan en actividades contráctiles. Numerosas enfermedades genéticas caracterizadas por eritrocitos frágiles de forma anormal se atribuyen a mutaciones que alteran la estructura y función de la anquirina o de la espectrina.

Cuando se retiran las proteínas periféricas de los fantasma de eritrocitos, las membranas se fragmentan y forman vesículas pequeñas, lo que indica que la red interna de proteínas es necesaria para mantener la integridad de la membrana. Los eritrocitos son células circulantes que sufren considerable presión al atravesar los microscópicos capilares cuyo diámetro es mucho menor que el de los propios eritrocitos. Para atravesar estas vías tan estrechas, y tener que hacerlo todos los días, el eritrocito debe ser muy deformable, durable y capaz de resistir fuerzas de corte que tienden a desintegrarlo. Se piensa que la red de espectrina y actina confiere a la célula la resistencia, rigidez y plegabi-

lidad necesarias para efectuar la función que se le demanda. Cuando se descubrió por primera vez el esqueleto de la membrana del eritrocito se pensó que era una estructura única adecuada para la forma y necesidades mecánicas únicas de este tipo de célula. Sin embargo, conforme se examinaron otras células se observaron esqueletos de membrana de tipo similar que contenían miembros de la familia de la espectrina y la anquirina, lo que indica que el esqueleto interno de la membrana es una estructura ampliamente distribuida.

4-5 *Movimiento de sustancias a través de membranas celulares*

Puesto que el contenido de una célula está rodeado en toda su extensión por la membrana plasmática, toda comunicación entre la célula y el medio extracelular debe ser a través de esta estructura. En cierto sentido, la membrana plasmática tiene doble "responsabilidad". Por un lado, debe retener los materiales disueltos dentro de la célula, de modo que no salgan de la misma por simple escurrimiento hacia el medio; por otra parte, debe permitir el intercambio necesario de materiales hacia adentro y afuera de las células. La bicapa de lípidos de la membrana es ideal para prevenir la pérdida de solutos polares con carga eléctrica de una célula, pero deben tenerse algunas precauciones en relación con el ingreso de nutrientes y la salida de productos de desperdicio que pudieran ser bloqueados por la bicapa de lípidos relativamente impermeable. Como se describirá más adelante, la membrana plasmática es una barrera con **permeabilidad selectiva**; es decir, no es igualmente permeable a todo tipo de solutos. Esta selectividad permite que la concentración de sustancias dentro de las células sea notablemente diferente de su concentración en el exterior, condición necesaria para la vida de una célula.

Para entender la naturaleza selectivamente permeable de la membrana plasmática es necesario considerar cómo atraviesan esta estructura las moléculas individuales. Básicamente hay dos medios para dicho movimiento: por difusión pasiva o por algún tipo de transporte activo acoplado a energía. Ambos tipos de movimiento pueden producir flujo neto de un ion o compuesto particular. El término **flujo neto** indica que el movimiento de la sustancia al interior de la célula (*flujo interno*) y hacia afuera de la misma (*flujo externo*) no está en equilibrio, sino que más bien uno excede al otro.

Se conocen varios procesos mediante los cuales se desplazan sustancias a través de las membranas: difusión simple a través de la bicapa de lípidos; difusión simple a través de un canal acuoso revestido de proteína; difusión facilitada, y transporte activo (fig. 4-32). Consideraremos cada uno por separado, pero primero analizaremos la energética del movimiento de solutos.

Energética del movimiento de solutos

Difusión es un proceso espontáneo mediante el cual una sustancia se desplaza desde una región de concentración

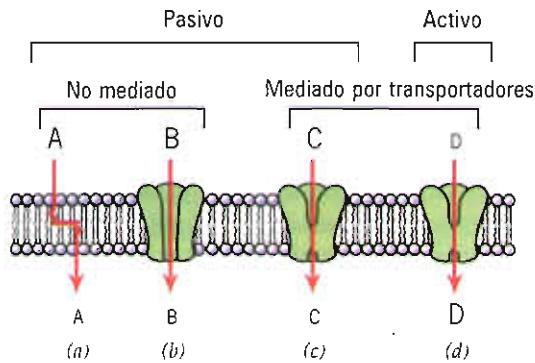


FIGURA 4-32. Cuatro mecanismos básicos para el desplazamiento de moléculas de soluto a través de membranas. El tamaño relativo de las letras indica la dirección de los gradientes de concentración. *a)* Difusión simple a través de la bicapa, la cual siempre procede de los sitios de mayor a menor concentración. *b)* Difusión simple a través de un canal acuoso formado dentro de una proteína integral de membrana o un agrupamiento de dichas proteínas. Igual que en *a*, el movimiento siempre es a favor del gradiente de concentración. *c)* Difusión facilitada en la cual las moléculas de soluto se enlazan específicamente a una proteína transportadora de la membrana, pero igual que en *a* y *b*, el movimiento siempre es desde el punto de mayor al de menor concentración. *d)* Transporte activo mediante una proteína transportadora con un sitio específico de enlace que sufre cambios de afinidad gracias a la energía liberada por un proceso exergónico, como la hidrólisis del ATP. El movimiento ocurre contra un gradiente de concentración.

elevada a una región de menor concentración, y que por último elimina la diferencia de concentración entre las dos regiones. Como se analizó en la página 80 del capítulo 3, la difusión depende del movimiento al azar de solutos y es un proceso exergónico debido al incremento de entropía representado por la distribución al azar de las moléculas. El siguiente análisis se restringe a la difusión de sustancias a través de membranas.

El cambio de energía libre que ocurre cuando un soluto difunde a través de una membrana depende de la magnitud del gradiente de concentración, o sea, la diferencia de concentración entre los dos compartimientos situados a cada lado de la membrana. Si el soluto no es un electrólito (partícula sin carga eléctrica), se observa la siguiente relación para el movimiento de una sustancia al interior de la célula:

$$\Delta G = RT \ln \frac{[C_i]}{[C_o]}$$

$$\Delta G = 2.303 RT \log_{10} \frac{[C_i]}{[C_o]}$$

donde ΔG es la diferencia de energía libre (sección 3-1), R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta y $[C_i]/[C_o]$ es la relación entre las concentraciones del soluto en las superficies interna (i) y externa (o) de la membrana. A 25°C,

$$\Delta G = 1.4 \text{ kcal/mol} \cdot \log_{10} \frac{[C_i]}{[C_o]}$$

(para los valores RT véase pág. 84)

Si la proporción entre $[C_i]/[C_o]$ es menor de 1.0, entonces el log de la proporción es negativo, ΔG es negativo y la entrada neta de soluto es termodinámicamente favorecida (exergónica). Por ejemplo, si la concentración externa de soluto equivale a 10 veces la concentración interna, $\Delta G = -1.4 \text{ kcal/mol}$. Por lo tanto, mantener una concentración 10 veces mayor de un lado es igual a almacenar 1.4 kcal/mol. Conforme el soluto se desplaza al interior de la célula, el gradiente de concentración disminuye y ΔG se reduce hasta que en el equilibrio se convierte en cero. Para calcular ΔG del movimiento de un soluto hacia afuera de la célula, el término correspondiente a la proporción entre las concentraciones se convierte en $[C_o]/[C_i]$.

Si el soluto es un electrólito (una especie con carga neta), también se debe considerar la diferencia total de carga entre los dos compartimientos. Como resultado de la mutua repulsión entre iones con carga semejante, para un electrólito es termodinámicamente desfavorable desplazarse de un compartimiento a otro a través de una membrana con carga total del mismo signo. A la inversa, si la carga del electrólito es de signo opuesto a la del compartimiento hacia el cual se desplaza, el proceso es termodinámicamente favorecido. Cuanto mayor sea la diferencia de carga (*diferencia de potencial o voltaje*) entre los dos compartimientos, mayor será la diferencia de energía libre. Por lo tanto, la capacidad de un electrólito para difundir de un compartimiento a otro depende de dos gradientes: un gradiente químico determinado por la diferencia de concentración de la sustancia entre los dos compartimientos y un gradiente de potencial eléctrico determinado por la diferencia de cargas. Estas diferencias en conjunto se combinan para formar un **gradiente electroquímico**. La diferencia de energía libre para la difusión de un electrólito *al interior* de la célula es

$$\Delta G = RT \ln \frac{[C_i]}{[C_o]} + zF\Delta E_m$$

donde z es la valencia del soluto, F es la constante de Faraday (23.06 kcal/V • equivalente, donde un equivalente es la cantidad de electrólitos que posee un mol de carga), y ΔE_m es la diferencia de potencial (en voltios) entre los dos compartimientos.

La interrelación entre diferencias de concentración y de potencial se observa en la difusión de iones potasio (K^+) hacia afuera de la célula. La salida del ion es favorecida por el gradiente de concentración de K^+ , que corresponde a una mayor concentración de K^+ dentro de la célula, pero impedida por el gradiente eléctrico que representa una carga eléctrica negativa en el interior de la célula con relación al exterior. Analizaremos este tema en detalle cuando se consideren los potenciales de membrana y los impulsos nerviosos, en la página 154.

Difusión de sustancias a través de membranas

Un no electrólito debe satisfacer dos condiciones para difundir al interior de una célula a través de la membrana plasmática. La sustancia debe estar presente en concentración más elevada fuera de la célula y la membrana debe ser

permeable a la sustancia. Una membrana puede ser permeable a un soluto determinado: 1) porque el soluto pasa directamente a través de la bicapa de lípidos, o 2) porque dicho soluto es capaz de atravesar un poro acuoso situado en el espesor de la membrana que impide el contacto del soluto con las moléculas lípidas de la bicapa. Consideraremos primero la ruta en la cual una sustancia se disuelve en la bicapa de lípidos para atravesar la membrana. El análisis de esta ruta obliga a considerar la polaridad de un soluto.

Una medida simple de la polaridad (o no polaridad) de una sustancia es su *coeficiente de partición*, o sea la proporción entre su solubilidad en aceite y su solubilidad en agua. El coeficiente de partición para un compuesto se mide disolviendo la sustancia en aceite y en agua por separado, mezclando luego los dos solventes inmiscibles con la sustancia disuelta y agitándolos, lo que permite que se separen en dos fases y se mida la concentración del soluto en cada fase. El coeficiente de partición es la concentración en aceite dividida entre la concentración en agua. La importancia de la liposolubilidad para la permeabilidad se muestra en el cuadro 4-5, donde se compara la penetración de una serie de alcoholes con coeficiente de partición decreciente a través de la membrana del eritrocito. La figura 4-33 muestra la relación entre coeficiente de partición y permeabilidad para algunos compuestos. Es evidente que a mayor liposolubilidad la penetración es más rápida. A finales del siglo XIX, observaciones de este tipo suministraron el primer indicio de que la frontera externa de la célula podía contener una capa de lípidos.

Otro factor que determina la velocidad de penetración de un compuesto a través de una membrana es su tamaño. Si dos moléculas tienen coeficientes de partición aproximadamente iguales, las moléculas de menor tamaño tienden a penetrar en la bicapa de lípidos de una membrana con mayor rapidez en comparación con la molécula más grande. Moléculas sin carga y muy pequeñas penetran rápidamente a través de las membranas celulares. Por consiguiente, las membranas son muy permeables a moléculas inorgánicas pequeñas, como O_2 , CO_2 , NO y H_2O , que parecen deslizarse entre fosfolípidos adyacentes.

En contraste, moléculas polares más grandes, como azúcares, aminoácidos e intermediarios fosforilados, muestran poca penetrabilidad en la membrana. Por consiguiente, la bicapa de lípidos de la membrana plasmática suministra una eficaz barrera que evita la difusión de estos metabolitos esenciales hacia el exterior de la célula. Puesto

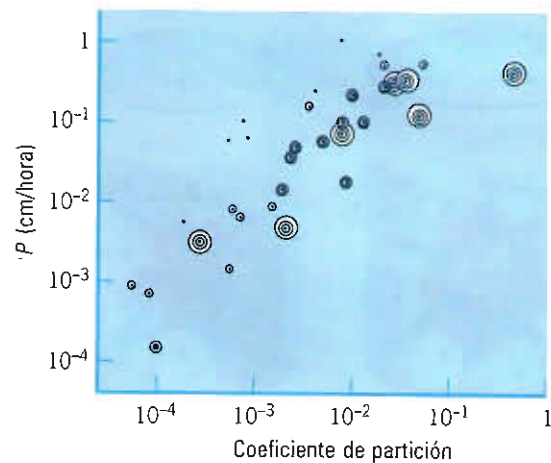


FIGURA 4-33. Determinación de la relación entre el coeficiente de partición y la permeabilidad. El coeficiente de partición se expresa como la solubilidad de un soluto en aceite y la solubilidad en agua. La permeabilidad se expresa como penetrancia (P) en cm/hora. Los valores se obtuvieron al estudiar la penetración de solutos en células del alga *Chara*. El tamaño de los círculos suministra una medida relativa del peso molecular del compuesto. Es evidente la notable importancia de la solubilidad de lípidos.

que algunas de estas moléculas (p. ej., azúcares y aminoácidos) deben entrar a las células procedentes del torrente sanguíneo, al parecer no lo hacen por simple difusión. En vez de eso deben disponer de mecanismos especiales para penetrar a través de la membrana plasmática. Estos mecanismos permiten a una célula controlar el movimiento de sustancias a través de la barrera situada en su superficie. Posteriormente volveremos a esta característica de las membranas.

Difusión de agua a través de las membranas

Las moléculas de agua se desplazan con mucha mayor rapidez a través de una membrana celular que los iones y pequeños solutos polares comúnmente presentes en las células, los cuales son casi impenetrables. Debido a esta diferencia de penetrabilidad del agua en comparación con solutos se dice que las membranas son **semipermeables**. El agua se mueve rápidamente a través de una membrana semipermeable desde una región de baja concentración hasta otra de alta de concentración de *soluto*. Este proceso se denomina **ósmosis** y puede demostrarse fácilmente colocando la célula en una solución con una concentración de soluto diferente de la presente en el interior de la propia célula.

Cuando una membrana semipermeable separa dos compartimientos con concentración diferente de un soluto, se dice que el compartimiento de concentración más alta es **hipertónico** (o **hiperosmótico**) en relación con el compartimiento de concentración más baja de soluto, que se describe como **hipotónico** (o **hiposmótico**). Si se coloca una célula en una solución hipotónica, la célula gana agua con rapidez por ósmosis y se hincha (fig. 4-34, a). A la inversa, una célula colocada en una solución hipertónica rápidamente pierde agua por ósmosis y se encoge (fig. 4-34, b). A partir de estas sencillas observaciones es evidente que el control

CUADRO 4-5. Relación entre coeficiente de partición y tasa de penetración de una sustancia

	Coeficiente de partición ($\times 10^2$)	Tasa relativa
Alcohol metílico	0.78	0.99
Glicerol etil éter	0.74	0.077
Propilenglicol	0.57	0.087
Glicerol metil éter	0.26	0.043
Etilenglicol	0.049	0.043
Glicerol	0.007	0.00074
Eritritol	0.003	0.000046

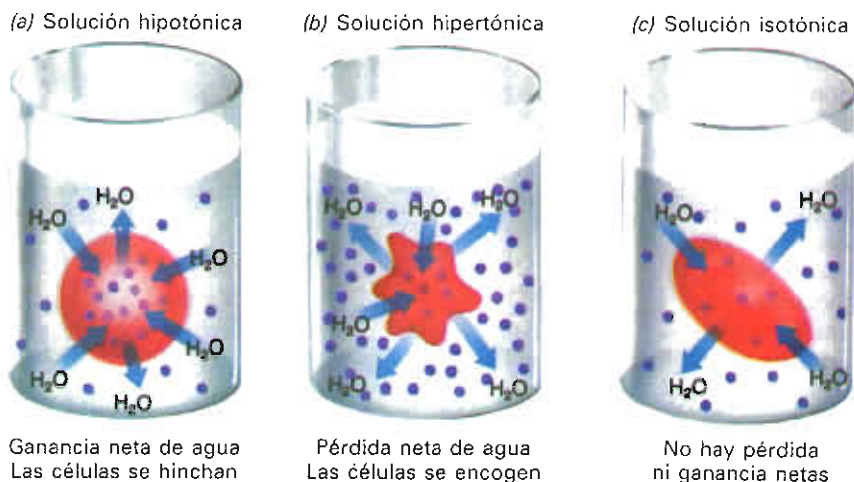


FIGURA 4-34 Efectos de la diferencia de concentración de solutos en lados opuestos de la membrana plasmática. *a)* Una célula colocada en solución hipotónica (con menor concentración de soluto que la célula) se hincha debido a ganancia neta de agua por ósmosis. *b)* Una célula en solución hipertónica se encoge debido a pérdida neta de agua por ósmosis. *c)* Una célula colocada en solución isotónica mantiene un volumen constante debido a que el flujo de agua por ósmosis es igual al interior que al exterior.

del volumen celular depende sobre todo de la relación entre concentración de solutos en el interior de la célula en comparación con la concentración en el medio extracelular. La mayor parte de las células mantienen un volumen apropiado al desplazar iones hacia adentro y afuera de la célula hasta que la concentración interna del soluto (incluyendo una concentración elevada de proteínas disueltas) sea igual a la concentración del soluto externo. En estas condiciones, los líquidos interno y externo son **isotónicos** (**isosmóticos**) y no hay movimiento neto de agua hacia adentro o afuera de la célula (fig. 4-34, c).

La ósmosis es un factor importante para numerosas funciones del cuerpo. Por ejemplo, el tubo digestivo secreta varios litros de líquido que se reabsorbe osmóticamente en las células que revisten el intestino. Si este proceso de reabsorción no ocurre, como en el caso de la diarrea intensa, se corre el riesgo de una rápida deshidratación. Las plantas aprovechan la ósmosis de diferentes maneras. Cuando una célula vegetal permanece en una solución hipotónica, gana agua y se hincha, igual que una célula animal. La célula animal finalmente estalla en el medio hipotónico, pero la célula vegetal, que posee una pared celular externa rígida, alcanza un volumen máximo y en vez de estallar genera presión interna (*turgencia*) aplicada contra la pared que la rodea (fig. 4-35, *a*). Si la célula vegetal se coloca en un medio hipertónico, su volumen disminuye conforme la membrana plasmática tira de la pared celular que la rodea, proceso conocido como *plasmólisis* (fig. 4-35, *b*). La presión desarrollada gracias al fenómeno de la turgencia suministra apoyo a las plantas no leñosas y a ciertas partes de las plantas leñosas, como las hojas. La pérdida de agua por ósmosis hace que las plantas pierdan turgencia y se marchiten.

Difusión de iones a través de las membranas

La bicapa de lípidos que forma el centro de las membranas biológicas es muy permeable a sustancias con carga eléctrica, incluyendo iones pequeños como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- . Incluso el movimiento (**conductancia**) de estos iones a través de las membranas desempeña un papel crítico en múltiples actividades celulares, que comprenden generación y propagación de impulsos nerviosos, secreción de sustan-

cias hacia el espacio extracelular, contracción muscular, regulación del volumen celular y apertura de los poros de los estomas situados en las hojas de la planta. Hace más de 40 años, Alan Hodgkin, Bernard Katz y Andrew Huxley, tres fisiólogos ingleses, trabajando con un axón gigante de células nerviosas de calamar, propusieron por primera vez que las membranas celulares contenían canales iónicos permeables a iones específicos.

En la actualidad, los biólogos han identificado un sorprendente número de canales iónicos, cada uno formado por proteínas integrales de la membrana que rodean un poro acuoso. La mayor parte de los canales iónicos son sumamente selectivos y sólo permiten el paso de un tipo particular de ion. Igual que en la difusión de otros tipos de solutos a través de membranas, la difusión de iones por un canal siempre es "cuesta abajo", o sea, desde un estado de mayor energía a otro de menor energía (pág. 80, cap. 3). Los canales iónicos son *bidireccionales*, permiten el paso de iones en ambas direcciones y el flujo neto del ion depende del gradiente electroquímico.

Nuestra comprensión de la estructura y la operación de los canales iónicos se ha desarrollado más en años recientes gracias al gran avance tecnológico, que incluye:

- Aislamiento y clonación de genes que codifican las proteínas que constituyen los canales.
- Deducción de la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas y predicción subsecuente por computadora de la forma de organización de estas proteínas dentro de una membrana.
- Alteración por mutagénesis dirigida a un sitio de la secuencia de nucleótidos en el gen para producir un polipéptido selectivamente alterado cuyas propiedades se pueden someter a prueba.
- Aislamiento de estas proteínas y reconstitución de las mismas dentro de liposomas donde su actividad pueda estudiarse aislada de otras proteínas de la membrana.
- Inyección de genes (o de los correspondientes RNA mensajeros) que codifican para las proteínas del canal a células extrañas, como oocitos de anfibios, donde las proteínas se sintetizan e integran a la membrana plas-

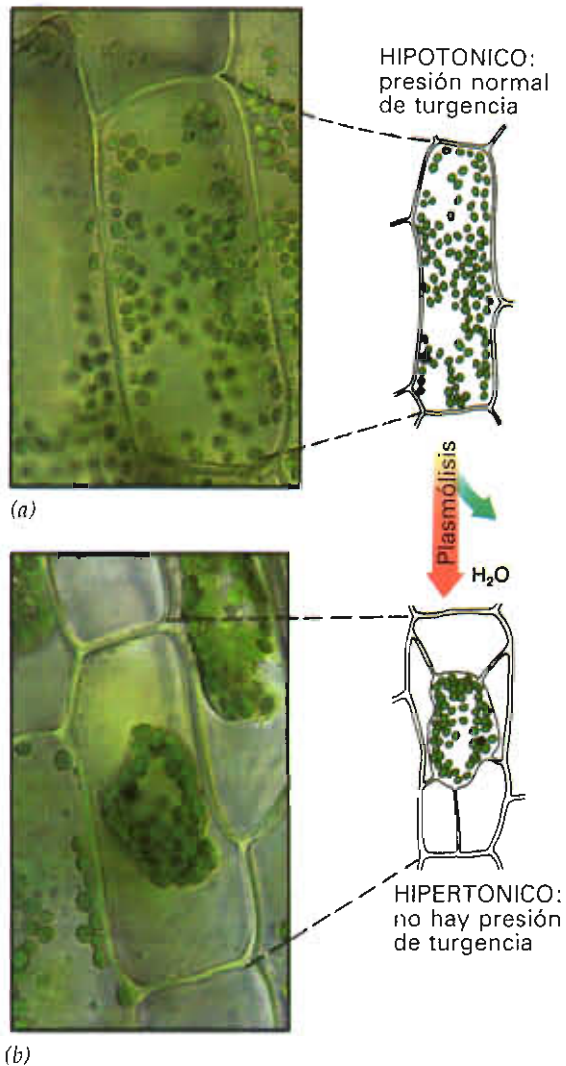


FIGURA 4-35. Efecto de la ósmosis sobre una célula vegetal. *a)* Las plantas acuáticas que viven en agua dulce están rodeadas por un medio hipotónico. Por lo tanto, el agua tiende a fluir al interior de las células generando presión por turgencia. *b)* Si la planta se coloca en solución hipertónica, como agua de mar, la célula pierde agua y la membrana plasmática se separa de la pared celular. (Cortesía de Ed Reschke.)

mática de la célula receptora y forman canales funcionales.

- Desarrollo de técnicas mediante las cuales se pueda estudiar la conductancia de iones a través de un solo canal iónico. Esto se lleva a cabo utilizando como electrodos micropipetas fabricadas con vidrio pulido que se colocan en la superficie externa de la célula y sellan la membrana por succión. El voltaje a través de la membrana se puede conservar (*pinzar*) en un valor determinado y medir la corriente originada en la pequeña porción de membrana que rodea a la pipeta (fig. 4-36).

Comparando la secuencia de aminoácidos en las proteínas que forman diferentes tipos de canales iónicos en

organismos tan diversos como bacterias, plantas y animales, se observa que todos los canales iónicos pertenecen a un pequeño número de *superfamilias* gigantes. Aunque los miembros de una superfamilia dada pueden mostrar selectividad muy diferente para cada ion, todas muestran bastante similitud en la secuencia de aminoácidos y estructura total al indicar que provienen de una sola proteína que alguna vez estuvo presente en un ancestro común que existió hace miles de millones de años.

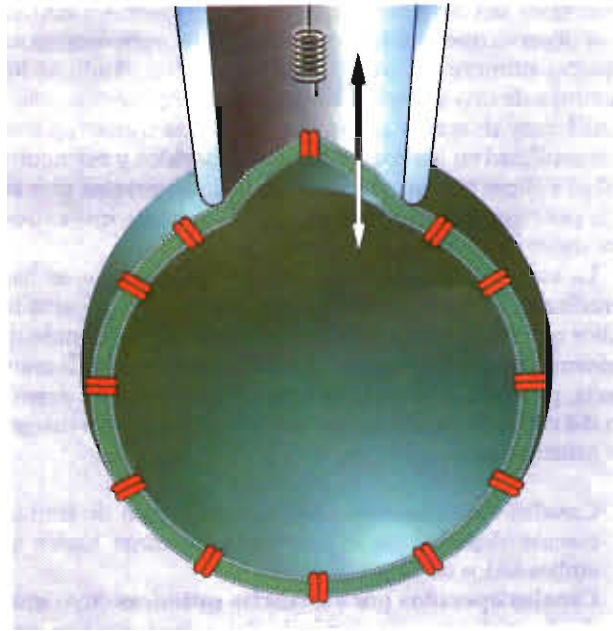
La mayor parte de estos canales iónicos que se han identificado pueden tener conformación abierta o cerrada; se dice que estos canales son las **compuertas**. El cambio de conformación cerrada a abierta, o sea, la abertura de la compuerta, puede ser inducida por varios factores, que dependen del canal en particular. Se han identificado dos categorías principales:

1. **Canales operados por voltaje** cuyo estado de conformación depende de la diferencia de carga iónica en ambos lados de la membrana.
2. **Canales operados por sustancias químicas** cuyo estado de conformación depende del enlace con una sustancia particular.

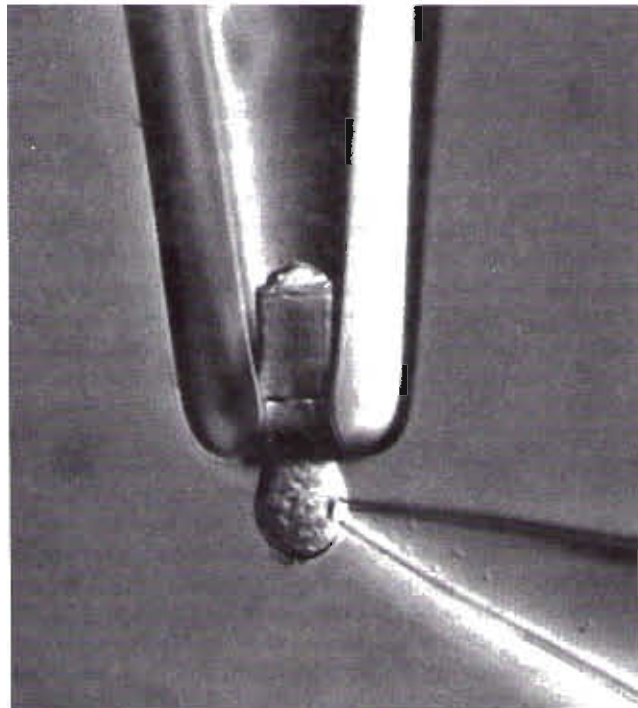
Algunos canales operados químicamente se abren (o cierran) luego del enlace de un ligando a la superficie externa del canal, otros se abren (o cierran) luego que un ligando se enlaza a la superficie interna del canal. Por ejemplo, los neurotransmisores como acetilcolina actúan sobre la superficie exterior de ciertos canales catiónicos, en tanto que los nucleótidos cíclicos como AMPc actúan sobre la superficie interna de ciertos canales iónicos para calcio.

Aunque los biólogos todavía deben cristalizar la proteína de un canal iónico y por difracción de rayos X obtener la imagen de su disposición tridimensional en la membrana, ya es mucho lo que se sabe acerca de la estructura de estas moléculas. El siguiente análisis se centrará en los canales que median el paso del ion potasio. Se han aislado genes que codifican diferentes canales para K^+ y se ha investigado la anatomía molecular de sus proteínas. La mayor parte de estas proteínas poseen la estructura básica bidimensional ilustrada en la figura 4-37, *a*. Los dominios N-terminal y C-terminal se sitúan en el lado citoplásmico de la membrana, en tanto que la porción media del polipéptido contiene seis segmentos que rodean la membrana (S1 a S6). Un canal de K^+ único consta de cuatro polipéptidos homólogos (subunidades) dispuestos simétricamente alrededor de un poro central conductor de iones, según se muestra en la figura 4-37, *b*. Por lo contrario, los canales para Na^+ y Ca^{2+} de la misma superfamilia constan de un solo polipéptido gigante con cuatro dominios hidrófilos separados, cada uno con seis segmentos que rodean la membrana.

Los canales de potasio pueden existir en conformación abierta o cerrada, según el voltaje a través de la membrana. Alterando sistemáticamente la secuencia de aminoácidos de la proteína mediante mutagénesis dirigida a un sitio, Richard Aldrich y sus colegas, de la Universidad Stanford, obtuvieron pruebas de que el canal se cierra por medio de "una esfera atada a una cadena". Los 19 aminoácidos que forman la porción N-terminal del polipéptido actúan como



(a)



(b)

FIGURA 4-36. Medición de la conductancia de un canal iónico por la técnica de la pinza de voltaje. *a)* En esta técnica se coloca una micropipeta de vidrio altamente pulido contra una porción de la superficie externa de la célula y luego se aplica succión para sellar el borde de la micropipeta contra la membrana plasmática. Puesto que la pipeta contiene un alambre conductor que sirve como electrodo, se puede aplicar voltaje a través de la porción de membrana incluida en la pipeta y medir la respuesta representada por el flujo de iones a través de los canales de la membrana. Como se indica en la figura, la micropipeta puede incluir una porción de membrana que contenga un solo canal iónico, lo que permite a los investigadores estudiar la apertura y cierre de las compuertas de un solo canal y también su conductancia con diferentes voltajes aplicados. *b)* La micrografía muestra el registro efectuado en la porción pinzada de una sola célula fotorreceptora de la retina de salamandra. Una parte de la célula se arrastra al interior de la micropipeta-electrodo de vidrio mediante succión, en tanto que una segunda micropipeta-electrodo (abajo a la derecha) está sellada contra una pequeña porción de membrana plasmática en otra región de la célula. (*b:* Según T.D. Lamb, H.R. Matthews y V. Torre, *J. Physiology* 372:319, 1986.)

interacciones de los residuos cargados positivamente situados en la hélice S4 con residuos con carga negativa situados sobre hélices vecinas, lo que provoca cambios de conformación en el polipéptido que conducen a liberar la “esfera” y abrir la boca del poro. Una vez abierto el poro pueden pasar a través del canal más de un millón de iones potasio por segundo. Debido a este gran flujo iónico, la apertura de un número relativamente pequeño de canales K^+ puede tener un impacto significativo sobre las propiedades eléctricas de la membrana (página 156).

Algunos estudios indican que el canal K^+ mide alrededor de 3 Å (0.3 nm) de diámetro en su punto más estrecho, justo el calibre suficiente para permitir el paso de un solo ion potasio (más o menos 2 Å de diámetro) luego de despojarse de la capa de agua que lo rodea. Se cree que cada canal tiene cuando menos tres sitios capaces de enlazarse selectivamente a un ion potasio. Estos sitios tal vez se localicen en el segmento H5 del polipéptido (fig. 4-37, *a*), que puede formar parte de la pared del poro hidrófilo. La repulsión electrostática entre varios iones K^+ sumamente próximos proporciona el mecanismo para impulsar los iones a través del poro con tal rapidez.

Una sola célula puede poseer varios canales K^+ diferentes que se abren y cierran en respuesta a diversos voltajes. Además, el voltaje requerido para abrir o cerrar un canal K^+ particular puede variar según si la proteína del canal está fosforilada o no, lo que a su vez es regulado por hormonas y otros factores. Es evidente que la función del canal iónico se encuentra bajo control de un complicado conjunto de diversos agentes reguladores.

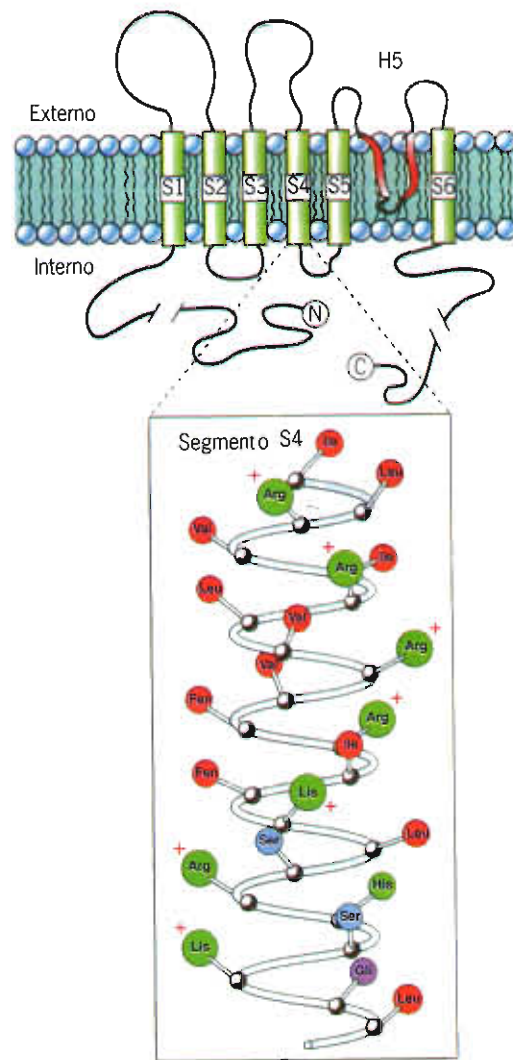
Nuestra mejor comprensión de la estructura tridimensional de un canal iónico se ha logrado por análisis con microscopio electrónico de alta resolución del receptor nicotínico para acetilcolina, un canal operado por ligando, que es el tema tratado en la sección *La vía experimental*, al final de este capítulo.

Difusión facilitada

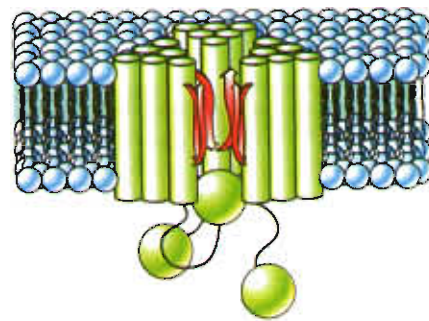
La difusión de una sustancia a través de una membrana siempre ocurre desde una región de mayor concentración

“esfera” oscilante que puede cerrar la boca del canal y bloquear el paso de iones (fig. 4-37, *b*). Se cree que una hélice S4 transmembrana (fig. 4-37, *a*, recuadro) que contiene 7 residuos aminoácidos con carga positiva situados cada tercer residuo a lo largo de la cadena del polipéptido regula la apertura y cierre del canal. Se ha determinado que esta porción de la proteína actúa como sensor de voltaje. Los cambios de carga iónica a través de la membrana alteran las

FIGURA 4-37. El canal del K⁺. a) Figura bidimensional de un canal de ion potasio que muestra los seis segmentos transmembrana y una porción del polipéptido (llamada H5) que se insinúa en la bicapa para formar parte de la pared del canal. El recuadro muestra la secuencia de aminoácidos del segmento transmembrana S4 del canal para ion K⁺ de *Drosophylla*, el cual contiene siete cadenas laterales con carga positiva que pueden servir como sensores de voltaje. Las cadenas laterales con carga positiva se sitúan cada tercer residuo a lo largo de la hélice. b) Mecanismo propuesto para manejar la compuerta del canal de K⁺ en el cual una parte de la proteína actúa como una esfera sobre el extremo de una cadena para ocluir la abertura interna del canal. No se muestra uno de los cuatro polipéptidos que constituyen el canal tetramérico.



(a)



(b)

en un lado hacia otra de menor concentración en el otro lado de la membrana, pero las sustancias no siempre difunden a través de la bicapa de lípidos o de un canal abierto. Se conocen muchos ejemplos donde la sustancia que debe difundir primero se une selectivamente a una proteína que atraviesa la membrana, denominada **facilitador del transporte**,² encargada de facilitar el proceso de difusión. Se cree que el enlace del soluto a un facilitador de transporte sobre un lado de la membrana desencadena un cambio de conformación en la proteína que expone el soluto en la otra superficie de la membrana a partir de la cual puede difundir cuesta abajo siguiendo su gradiente de concentración. En la figura 4-38 se ilustra un ejemplo de este mecanismo. La **difusión facilitada**, como se denomina a este proceso, se asemeja en gran parte a una reacción catalizada por enzimas.

Igual que las enzimas, los facilitadores de transporte son específicos para las moléculas que transportan, por ejemplo pueden discriminar entre los estereoisómeros D y L (pág. 43, cap. 2). Además, tanto las enzimas como los transportadores muestran cinética de tipo saturación (fig. 4-39). A diferencia de los canales iónicos, que pueden conducir millones de iones por segundo, la mayor parte de los facilitadores de transporte sólo pueden desplazar a través de la membrana cientos o miles de moléculas de soluto por segundo. Otra característica importante de los facilitadores de transporte es que, igual que las enzimas y los canales iónicos, su actividad puede regularse para satisfacer las necesidades de la célula en determinado momento. La difusión facilitada es particularmente importante para mediar la entrada y la salida de solutos polares como azúcares y aminoácidos que no pueden penetrar la bicapa de lípidos. Esto se ilustra en la siguiente sección.

Debido a que los facilitadores de transporte operan pasivamente, o sea, sin acoplarse a un sistema capaz de liberar energía, pueden mover el movimiento en forma

² El término facilitador de transporte se emplea aquí para distinguir estas proteínas de los transportadores activos estudiados más adelante en este capítulo y cuya actividad se acopla a la liberación de energía. Técnicamente, el término transportador se aplica a una proteína de la membrana que sólo puede enlazarse cada vez a un soluto en un lado de la membrana y en la cual un cambio de conformación actúa como mecanismo para mover la sustancia a través de la membrana. Esta definición distingue los transportadores de los canales, los cuales, cuando se abren, pueden unirse al mismo tiempo a solutos en ambos lados de la membrana. Conforme se aprende más acerca de estas proteínas, la diferencia entre canales y transportadores va desapareciendo.

satisfactoria en ambas direcciones. La dirección del flujo neto depende sólo de la concentración relativa de la sustancia en ambos lados de la membrana.

El transportador de glucosa: un ejemplo de difusión facilitada

La glucosa es la principal fuente de energía directa para el cuerpo, y la mayor parte de las células contienen una pro-

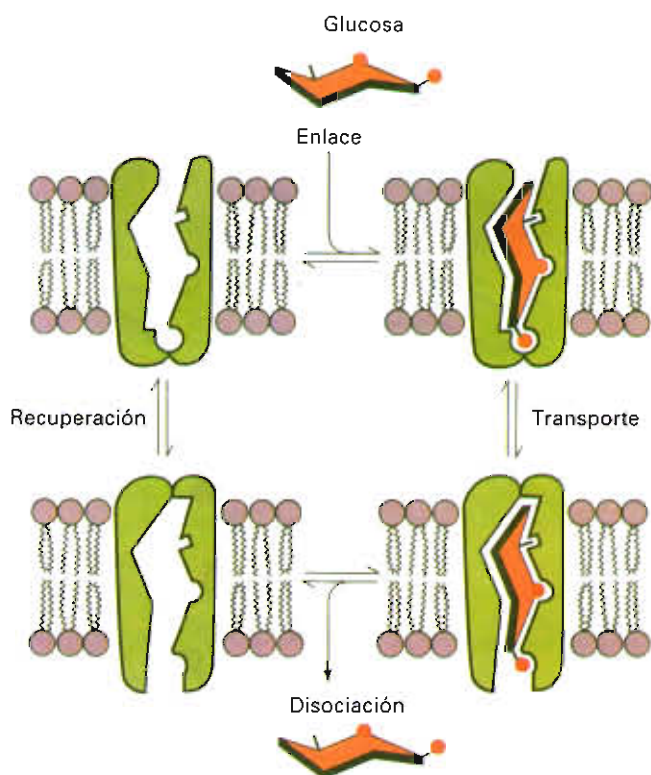


FIGURA 4-38. Difusión facilitada. Esquema de un modelo para la difusión facilitada de glucosa que implica un transportador con conformación alternante para exponer el sitio de enlace a glucosa en el lado interno o en el lado externo de la membrana. (Según S.A. Baldwin y G.G. Lienhard, Trends in Biochem. Sci. 6:210, 1981.)

teína de membrana que facilita la difusión de glucosa desde la corriente sanguínea al interior de la célula (como se muestra en la figura 4-38). El gradiente favorable para la difusión continua de glucosa hacia el interior de las células se mantiene por fosforilación del azúcar luego que penetra al

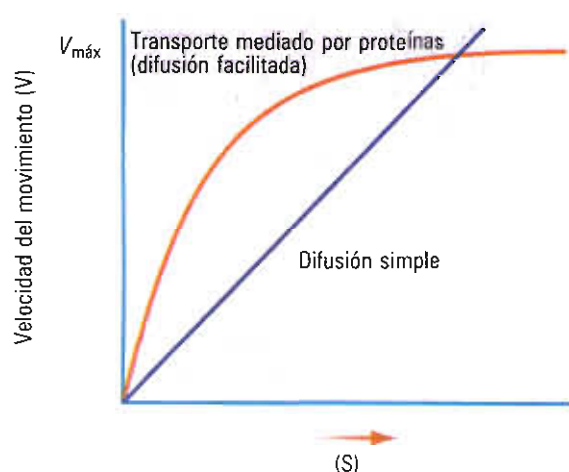


FIGURA 4-39. Cinética de la difusión facilitada en comparación con la simple difusión física.

citoplasma, por lo que desciende la concentración intracelular de glucosa. Los seres humanos y otros mamíferos estudiados tienen cuando menos cinco proteínas relacionadas que actúan como facilitadoras del transporte de glucosa (estas variantes genéticas se refieren como *isoformas*). Las isoformas denominadas GLUT1-GLUT5 se diferencian por los tejidos en los cuales se localizan y también por su cinética y características reguladoras.

La insulina, hormona producida por las células endocrinas del páncreas, desempeña un papel clave para mantener una concentración apropiada de azúcar en la sangre. Una de las principales acciones de la insulina es favorecer la captación de glucosa proveniente de la sangre por las células musculares, en cuyo interior se almacena como glucógeno o se emplea directamente como combustible para la actividad muscular y por las células adiposas donde la glucosa se convierte en grasa. Los músculos cardíaco y esquelético, y las células adiposas comparten una isoforma común de proteína facilitadora del transporte de glucosa, en especial GLUT4. Si la concentración de insulina es baja, estas células contienen relativamente pocos transportadores de glucosa en su superficie. Por lo contrario, dichos transportadores se encuentran en la membrana de las vesículas citoplásmicas (fig. 4-40). Cuando la concentración de insulina se eleva, esta hormona actúa sobre células específicas para estimular la translocación de las vesículas desde el citoplasma hasta la superficie celular. Como resultado, los transportadores se incorporan a la membrana plasmática donde pueden actuar para eliminar glucosa de la sangre.

La causa de la diabetes mellitus es un defecto de la actividad de la insulina. En pacientes que sufren la enfermedad desde la infancia (diabetes tipo I), por lo general hay deficiencia en la producción de insulina debido a destrucción de las células productoras de insulina por el propio organismo. Por lo tanto, a los niños con diabetes tipo I de ordinario se les trata mediante inyección diaria de insulina. Por lo contrario, las personas que desarrollan diabetes en la edad adulta (diabetes tipo II), en general muestran concentración normal de insulina; el problema estriba en la incapacidad de las células específicas para responder a la hormona, sea por deficiencia de los receptores de insulina o por deficiencia de los transportadores GLUT4.

Transporte activo

En condiciones típicas, la concentración interna de K^+ en las células de mamíferos es de casi 100 mM, en tanto que fuera de la célula sólo es de unos 5 mM. En consecuencia, hay un gradiente de concentración de K^+ muy pronunciado a través de la membrana plasmática que favorece la difusión de K^+ hacia afuera de la célula. Los iones sodio también se distribuyen de manera muy desigual a través de la membrana plasmática, pero el gradiente se establece en sentido opuesto: la concentración de Na^+ es de casi 150 mM en el lado externo de la célula y de 10 a 20 mM en el lado interno de la membrana plasmática. La diferencia de concentración para Ca^{2+} todavía es mayor; la concentración típica de 10^{-7} M en el citoplasma es 1 000 a 10 000 veces menor que la concentración en el exterior de la célula. La

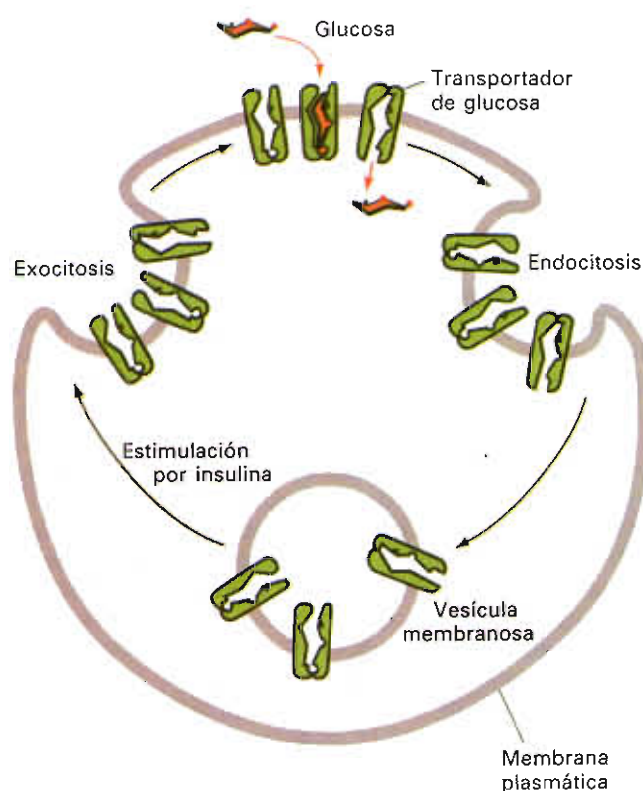


FIGURA 4-40. La insulina regula la captación de glucosa en el músculo y las células adiposas. Los transportadores de glucosa se almacenan en las paredes de las vesículas citoplásmicas formadas por gemación de la membrana plasmática (endocitosis). Cuando la concentración de insulina aumenta, las vesículas citoplásmicas se desplazan hacia la periferia de la célula. Las vesículas se fusionan con la membrana plasmática (exocitosis) y liberan los transportadores a la superficie de la célula donde pueden captar glucosa.

capacidad de una célula para generar estos pronunciados gradientes de concentración a través de su membrana plasmática no puede depender de difusión simple o facilitada. Estos gradientes se generan más bien por **transporte activo**.

Igual que la difusión facilitada, el transporte activo depende de proteínas integradas a la membrana capaces de unirse selectivamente a un soluto particular y desplazar dicha sustancia a través de la membrana impulsada por cambios en la conformación de la proteína. Sin embargo, a diferencia de la difusión facilitada, el movimiento de un soluto contra un gradiente requiere acoplar el ingreso de energía. En consecuencia, el movimiento endergónico de iones o de otros solutos a través de la membrana contra un gradiente de concentración debe acoplarse a un proceso exergónico, como hidrólisis de ATP, absorción de luz, transporte de electrones o flujo de otras sustancias a favor de un gradiente.

Acoplamiento del transporte activo a la hidrólisis de ATP

En 1957, el fisiólogo danés Jens Skou descubrió una enzima que hidroliza ATP en las células nerviosas del cangrejo que

sólo era activa en presencia de iones sodio y potasio (y también Mg^{2+} , que actúa como cofactor). Skou propuso, y estuvo en lo correcto, que esta enzima encargada de la hidrólisis de ATP era la misma proteína que actuaba en el transporte activo de los dos iones; la enzima se denominó **ATPasa Na^+-K^+** , o bomba sodio y potasio.

Los investigadores interesados en descubrir las propiedades de la ATPasa Na^+-K^+ pronto volvieron su atención a los fantasmas de eritrocitos. En la página 139 vimos que los eritrocitos se hinchan en soluciones hipotónicas hasta que la membrana plasmática es tan permeable que el contenido interno de las células escurre al exterior. Estos fantasmas de eritrocitos permeabilizados (*hemolizado*) se pueden colocar en soluciones de diferente composición iónica, permitir que se encojan a su tamaño original y entonces volverlos a sellar. Los fantasmas resellados pueden colocarse entonces en diferentes tipos de medio y evaluar las actividades de transporte de la membrana. Utilizando este sistema se observó que el transporte activo sólo ocurre cuando hay iones potasio fuera de la célula y iones sodio dentro de la misma. También debe haber ATP disponible dentro del fantasma restablecido; si el ATP se aplica externamente, la bomba no puede operar. De igual manera se determinó que la uabaína, un inhibidor del transporte activo de cationes ampliamente estudiado, sólo era eficaz cuando se aplicaba de forma externa sobre los fantasmas recuperados. La uabaína es un esteroide cardiotónico con estructura similar a la digital, un esteroide obtenido de la digital y empleado durante más de 200 años como tratamiento para insuficiencia cardíaca congestiva. La digital aumenta la fuerza de contracción del corazón inhibiendo la bomba de Na^+-K^+ , lo que desencadena una serie de acontecimientos que incrementan la disponibilidad de Ca^{2+} dentro de las células del músculo cardíaco. En años recientes se han acumulado pruebas de que las células normalmente contienen tipos similares de compuestos denominados *endouabaínas*.

Los experimentos con fantasmas de eritrocitos ilustran claramente la naturaleza asimétrica de la bomba de sodio y potasio. Esta asimetría es una de las características más importantes de todos los sistemas de transporte activo. A diferencia del movimiento mediado por proteínas en los sistemas de difusión facilitada, que pueden transportar la sustancia igualmente bien en ambas direcciones, los sistemas de transporte activo se acoplan a una fuente de energía de tal manera que sólo pueden impulsar el movimiento de iones en una sola dirección. Numerosos estudios indican que la proporción de $Na^+:K^+$ bombeada por la ATPasa Na^+-K^+ no es de 1:1, sino de 3:2 (fig. 4-42). En otras palabras, por cada ATP hidrolizado se bombean tres iones sodio afuera y sólo dos iones potasio adentro de la célula. Debido a esta proporción de bombeo, la ATPasa Na^+-K^+ es *electrógena*, lo que significa que contribuye directamente a separar cargas eléctricas a través de la membrana.

La ATPasa Na^+-K^+ es un tetrámero que consta de dos tipos de subunidades (fig. 4-41), una subunidad alfa de mayor tamaño encargada de la actividad de transporte y una subunidad beta más pequeña que al parecer funciona sobre todo en la maduración y ensamblado de la bomba dentro de la membrana. Ambas subunidades atraviesan la membrana; la subunidad alfa contiene 8 a 10 segmentos

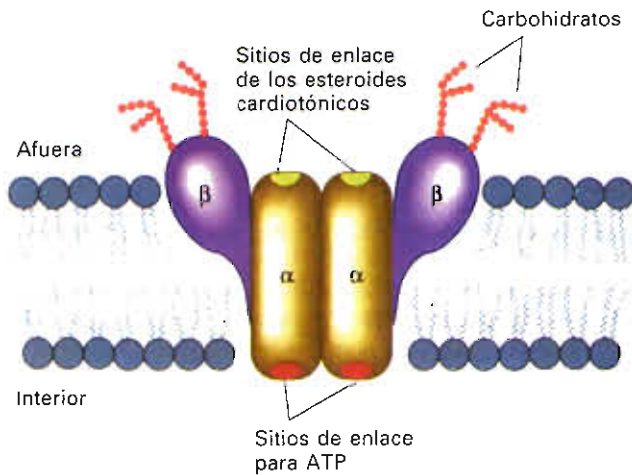


FIGURA 4-41. Modelo esquemático de ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$. La proteína de transporte consta de dos subunidades, una α y una β . Se indican los diferentes sitios funcionales sobre la subunidad alfa.

transmembrana semejantes, en tanto que la subunidad beta sólo contiene uno.

La ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ es un ejemplo de bomba tipo P para iones. La "P" significa "fosforilación" e indica que durante el ciclo de bombeo la hidrólisis de ATP transfiere un grupo fosfato a uno de los aminoácidos de la proteína de transporte, lo que a su vez provoca un cambio de conformación esencial dentro de la proteína. Los cambios de conformación son necesarios para modificar la afinidad de la proteína por los dos cationes que transporta. Consideremos la situación que confronta la proteína. Debe captar iones sodio o potasio en una región donde están presentes en concentración baja, lo que significa que la proteína debe poseer una afinidad relativamente alta por estos iones. A continuación, la proteína debe liberar los iones en el otro lado de la membrana frente a una concentración mucho mayor de ion. Para esto, la afinidad de la proteína por dicho ion debe disminuir. Por lo tanto, la afinidad para los iones debe ser diferente en ambos lados de la membrana, lo cual puede explicarse mejor mediante un cambio en la forma de la molécula de la proteína.

En la figura 4-42 se muestra un esquema del ciclo de bombeo de la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$. Cuando la proteína se une a tres iones Na^+ en el lado interno de la célula, sufre la fosforilación y cambia de la conformación E_1 a la conformación E_2 . En ese momento, los sitios de enlace quedan expuestos al compartimiento extracelular y la proteína pierde su afinidad por los iones Na^+ que entonces se liberan fuera de la célula. Una vez liberados los tres iones de sodio, la proteína capta dos iones potasio, se desfosforila y regresa a su conformación original E_1 . En ese estado, el sitio de enlace se abre en la superficie interna de la membrana y su afinidad por iones K^+ disminuye liberando estos iones dentro de la célula. Entonces el ciclo puede repetirse. La importancia de la bomba de sodio y potasio es evidente si consideramos que consume alrededor de un tercio de la energía

producida por la mayor parte de las células animales y dos tercios de la energía producida por células nerviosas.

Otros sistemas de transporte de iones

La bomba de sodio y potasio sólo se encuentra en células animales. Se piensa que esta proteína evolucionó en los animales primitivos como principal medio para conservar el volumen celular y como mecanismo para generar los pronunciados gradientes de Na^+ y K^+ que desempeñan un papel tan importante en la generación de impulsos en células nerviosas y musculares. Las células vegetales dependen sobre todo del transporte de H^+ por medio de una bomba tipo P situada en la membrana plasmática. Esta bomba de protones desempeña en las plantas un papel clave en el transporte secundario de solutos (analizado posteriormente), en el control del pH del citosol y tal vez en la regulación del crecimiento celular mediante acidificación de la pared de las células vegetales. Otro tipo de bomba P bien estudiado es la ATPasa Ca^{2+} presente en la membrana plasmática y las membranas del retículo endoplásmico. La función de esta bomba Ca^{2+} es activar el transporte de iones calcio hacia afuera del citoplasma, ya sea al espacio extracelular o a la luz del retículo endoplásmico.

A diferencia de las bombas tipo P, las bombas tipo V utilizan la energía del ATP sin formar una proteína intermedia fosforilada. Las bombas tipo V transportan activamente iones hidrógeno a través de las paredes de organelos y vacuolas del citoplasma (de allí su nombre tipo V). Se presentan en membranas de revestimiento de lisosomas, granulos secretorios y vacuolas de las células vegetales.

Otro grupo distinto de proteínas que desempeñan una función en el transporte activo de iones se clasifica como *transportadores del cartucho enlazado al ATP (CEA)*, debido a que todos los miembros de este grupo comparten un dominio homólogo de enlace al ATP. El transportador CEA mejor estudiado se describe en *La perspectiva humana*: Fibrosis quística: importancia clínica del transporte de membrana, en este capítulo. Como se analiza en la siguiente sección, no todas las bombas iónicas se acoplan directamente a la hidrólisis de ATP.

Aprovechamiento de la energía luminosa para el transporte activo de iones

Las bacterias del género *Halobacterium* viven en ambientes extremadamente salinos, como el Gran Lago Salado. Cuando crecen en condiciones anaerobias, las membranas plasmáticas de estas bacterias adquieren color púrpura (fig. 4-43) debido a la presencia de una proteína conjugada particular, la *bacteriorrodopsina*, que contiene retinal, el mismo grupo prostético presente en la rodopsina, la proteína conjugada de los bastoncillos de la retina de los vertebrados. La bacteriorrodopsina funciona absorbiendo protones en lado interno de la membrana y liberándolos en el lado externo, proceso que sólo ocurre cuando la bacteria crece en un ambiente iluminado. La absorción de energía luminosa por el grupo retinal induce una serie de cambios de conformación en la proteína que obliga a los protones a desplazarse a través de la molécula desde un residuo aminoácido específico a otro, lo que genera un gradiente de protones a través de la membrana.

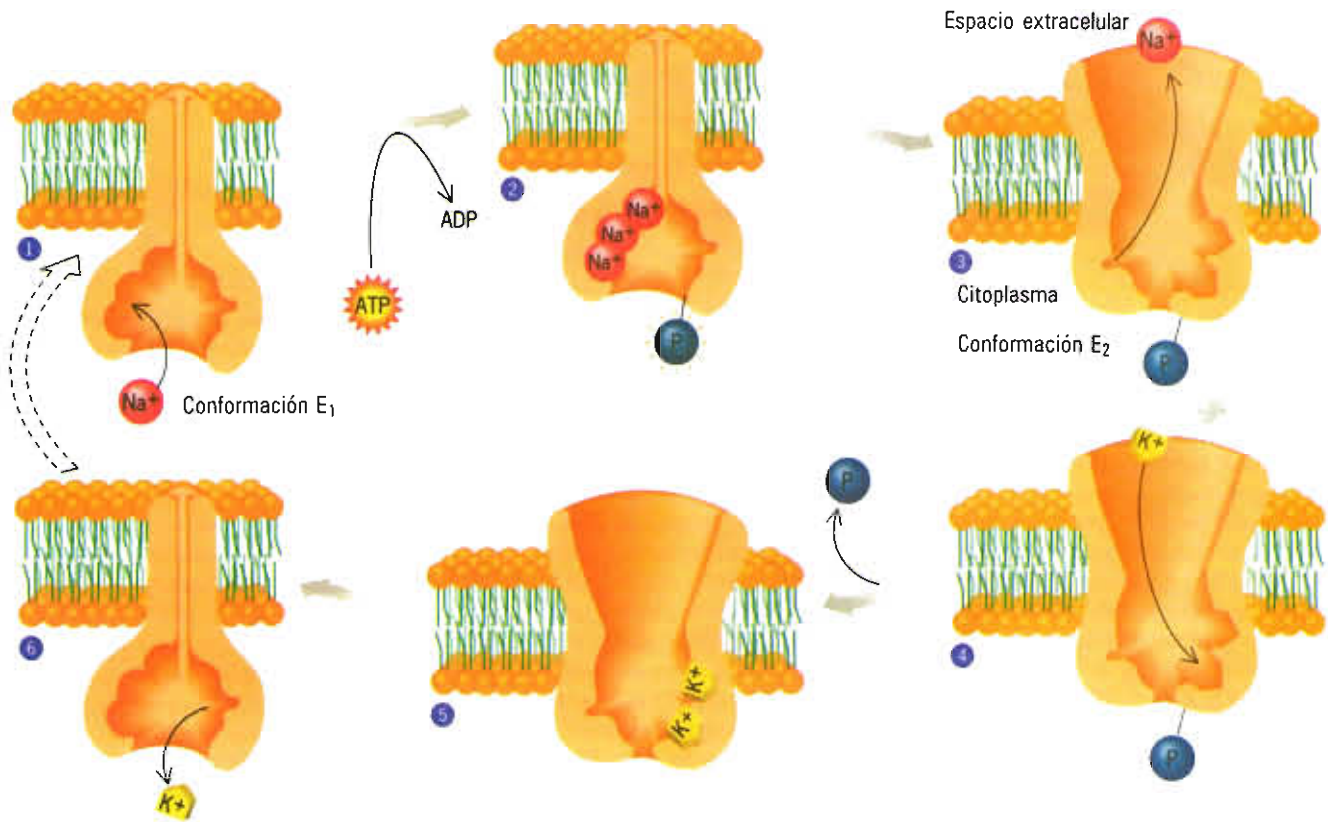


FIGURA 4-42. Concepto esquemático del ciclo de transporte de la ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$. Los iones sodio: 1) se enlazan a la proteína en el lado interno de la membrana; 2) se hidroliza el ATP y el fosfato se transfiere a la proteína, 3) cambiando su conformación, y permitiendo que los iones sodio sean transportados hacia el espacio externo. A continuación 4) se enlazan iones potasio a la proteína, 5) en seguida se eliminan los grupos fosfato, y 6) la proteína vuelve con rapidez a su conformación original desplazando iones potasio al interior de la célula. A diferencia de la difusión facilitada, los cambios en la forma de la proteína son inducidos por la energía liberada durante la hidrólisis de ATP, lo que permite que el sistema de transporte pueda desplazar iones contra sus gradientes de concentración.

Acoplamiento del transporte activo a los gradientes iónicos existentes

El establecimiento de gradientes de concentración, como los de Na^+ , K^+ , H^+ , constituye un medio para almacenar energía en las células. La célula emplea de varias maneras la energía potencial almacenada en gradientes iónicos para efectuar trabajo, incluyendo transporte de otros solutos. Considérense las funciones del intestino. En su luz, las enzimas desdoblan polisacáridos de peso molecular elevado para producir azúcares más simples, los cuales deben desplazarse a través de todo el espesor de las células epiteliales que revisten al intestino y alcanzar la corriente sanguínea. El movimiento de glucosa a través de la membrana plasmática apical (membrana de las células epiteliales frente a la luz del intestino) contra un gradiente de concentración ocurre mediante **cotransporte** con iones sodio, según se ilustra en la figura 4-44. La concentración de Na^+ se mantiene muy baja dentro de las células por acción del sistema de transporte activo **primario** (ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$), localizado en la membrana plasmática basal y lateral que bombea iones sodio fuera de la célula contra un gradiente de concentración. La tendencia de los iones sodio para difundir hacia adentro a



FIGURA 4-43. El color púrpura del agua en este charco salino al este del Sahara se debe a la presencia de numerosas bacterias púrpuras de los géneros *Halobacterium*. (Cortesía de Walter Stoeckenius, Universidad de California, San Francisco.)

LA PERSPECTIVA HUMANA

Fibrosis quística: importancia clínica del transporte de membrana

Una de cada 25 personas, en promedio, descendiente de ancestros del norte de Europa posee una copia del gen causante de la fibrosis quística. En otras palabras, estas personas son heterocigotas en ese locus genético. Puesto que no presentan síntomas del gen mutante, la mayor parte de los heterocigotos desconocen que son portadores (a menos que su DNA se someta a los procedimientos recientes de selección). En consecuencia, alrededor de uno de cada 2 500 lactantes de esa población caucásica ($1/25 \times 1/25 \times 1/4$) son homocigotos recesivos en este locus y nacen con fibrosis quística.

La fibrosis quística es una enfermedad por secreción anormal de líquido. Aunque varios órganos están afectados, incluyendo intestino, páncreas, glándulas sudoríparas y el conducto reproductor, de ordinario en el sistema respiratorio es donde se observan los efectos más graves. Las víctimas de fibrosis quística producen moco viscoso, resistente, muy difícil de expulsar de las vías respiratorias. Como resultado, estos individuos sufren infección pulmonar crónica que progre-

sivamente daña la función respiratoria.

En 1984 se demostró que las células cultivadas procedentes de pacientes con fibrosis quística muestran flujo externo anormalmente bajo de iones cloro, lo que sugiere que el defecto puede residir en un gen que codifica un canal o un transportador de iones. Puesto que el movimiento de agua hacia afuera de las células epiteliales por ósmosis está directamente afectado por el movimiento de sales, no es sorprendente que una reducción del flujo externo de cloro conduzca a un incremento de la concentración y por lo tanto de la viscosidad de las secreciones corporales.

En 1989 se aisló el gen de la fibrosis quística. Por primera vez, las víctimas de esta enfermedad vieron un rayo de luz al final de un largo y oscuro túnel: surgió la esperanza de encontrar una cura para su incapacitante enfermedad. Una vez determinada la secuencia del gen de la fibrosis quística y la secuencia de aminoácidos del correspondiente polipéptido se comprobó que el polipéptido era un transportador ABC. Igual que otros

transportadores de esta superfamilia, el polipéptido contiene dos dominios situados entre la bicapa de lípidos, cada uno con seis segmentos que atraviesan la membrana y dos dominios que unen nucleótidos (DUN) proyectados al interior del citoplasma (fig. PH 4-1). A diferencia de otros miembros de la superfamilia, la proteína implicada en la fibrosis quística incluye un dominio regulador (R) que contiene varios residuos de serina que pueden ser fosforilados por una proteincinasa (denominada PKA) activada por un AMP cíclico segundo mensajero (sección 15-2). Esta proteína recibió el nombre de *regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (RTFQ)*, término ambiguo que refleja el hecho de que los investigadores aún no están seguros de su verdadera función, si es un canal de cloro (a diferencia de otros miembros de la superfamilia que son transportadores activos) o una proteína que regula de alguna manera la conductancia del cloro a través de otros canales de la membrana. El problema se resolvió sólo después de purificar la proteína, incorporarla a bicapas de lí-

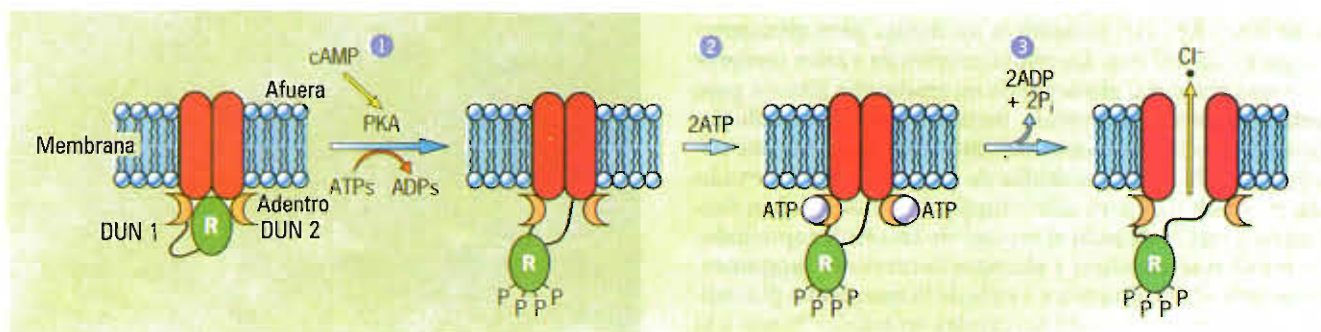


FIGURA PH 4-1. Hipótesis para explicar el doble control del dímero RTFQ. El AMP cíclico activa la proteincinasa, que fosforila residuos de serina del dominio R de la proteína (paso 1). El cambio de conformación inducido por la fosforilación facilita el enlace del ATP al dominio que une nucleótidos (DUN) de la proteína (paso 2). La hidrólisis del enlace de ATP abre el canal de cloro (paso 3). (Reimpreso con permiso de F.S. Collins, Science 256:776, 1992; © 1992 por American Association for the Advancement of Science.)

pidos artificiales y demostrar que actúa como canal de cloro regulado por AMP cíclico. Para abrir la compuerta aparentemente se requieren dos hechos independientes: la fosforilación del dominio R dependiente de AMP cíclico y el enlace de ATP al dominio de enlace con el nucleótido (fig. PH 4-1). La razón para este doble control sobre la conductancia del Cl^- todavía es incierta.

En años recientes los investigadores aislaron alrededor de 200 mutaciones diferentes que ocasionan fibrosis quística y se estudió el efecto de cada una de estas alteraciones sobre la estructura y función de la proteína (fig. PH 4-2). Como resultado, ahora se sabe más acerca de las bases moleculares de la enfermedad que de las bases fisiológicas de la patología acompañante en tejidos y órganos. En Estados Unidos, 70% de los alelos causantes de fibrosis quística contienen la misma alteración genética (designada $\Delta 508$), y todos ellos carecen de tres pares de bases de DNA que codifican una fenilalanina en la posición 508 dentro de uno de los dominios de unión a nucleótidos del polipéptido RTFQ. Investigaciones subsecuentes han revelado que los po-

lipéptidos RTFQ que carecen de este aminoácido particular no pueden procesarse normalmente dentro de las membranas del retículo endoplásmico y el complejo Golgi, y en realidad nunca alcanzan la superficie de las células epiteliales. En consecuencia, los pacientes con fibrosis quística homocigotos para el alelo $\Delta 508$ carecen por completo del canal de cloro RTFQ y padecen una forma grave de la enfermedad. Otros pacientes con fibrosis quística con formas menos graves poseen alelos mutantes que codifican una RTFQ capaz de alcanzar la superficie de las células, pero sólo pueden mediar una reducida conductancia al cloro. Las formas más leves se caracterizan por infertilidad, con daño escaso o ausente a órganos mayores.

A partir del aislamiento del gen causante de fibrosis quística, la meta de los investigadores ha sido desarrollar una cura mediante geneterapia, o sea, sustituir el gen defectuoso por un gen normal. La fibrosis quística es buen candidato para geneterapia debido a que los peores síntomas de la enfermedad son causados en células que revisten las vías respiratorias y, por lo tanto, son accesibles a sustancias sus-

ceptibles de administrar por inhalación en aerosol. Hasta ahora, los ensayos clínicos iniciados utilizan dos diferentes sistemas de administración. En un grupo de análisis, el gen normal RTFQ se incorporó al DNA de un adenovirus defectuoso, un tipo de virus que normalmente produce infección en vías respiratorias superiores. A continuación se permite que las partículas del virus recombinante infecten células de las vías respiratorias y envíen el gen normal a células genéticamente deficientes. En otros ensayos, el DNA que codifica al gen RTFQ normal se introduce a liposomas (página 124). Cuando se introducen en pulmones y vías respiratorias, los liposomas se fusionan con las membranas plasmáticas de células epiteliales y liberan su contenido de DNA en el interior del citoplasma. Hasta ahora, ambos métodos han tenido éxito para corregir transitoriamente el defecto genético en las células de vías respiratorias. Quizá los liposomas tengan ventaja sobre los virus como sistema de administración por la menor probabilidad de estimular una respuesta inmunológica destructiva dentro del paciente luego de tratamientos repetidos.

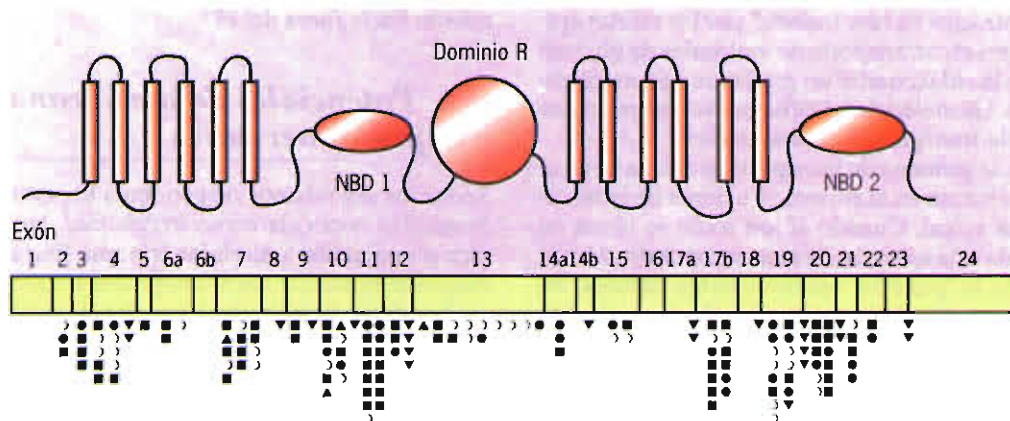


FIGURA PH 4-2. Identificación de mutaciones causantes de fibrosis quística. Se indica la localización y naturaleza de más de 150 mutaciones diferentes de FQ identificadas por el Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium bajo el esquema de una proteína RTFQ. (▲) supresión de estructura; (■) mutación en sentido equivocado; (●) mutación sin sentido; (○) mutación de cambio de estructura, y (▼) mutación por empalme. La mayor parte de estos tipos de mutación se analizan en el capítulo 11. Esta figura suministra una indicación de la variedad de alelos de un gen que pueden existir dentro de una población. Los números corresponden a los segmentos codificantes (exones) que constituyen al gen. La supresión $\Delta 508$, común en personas del norte de Europa, ocurre a nivel del décimo exón. (Reimpreso con permiso de F.S. Collins, *Science* 256:775, 1992; © 1992 por American Association for the Advancement of Science.)

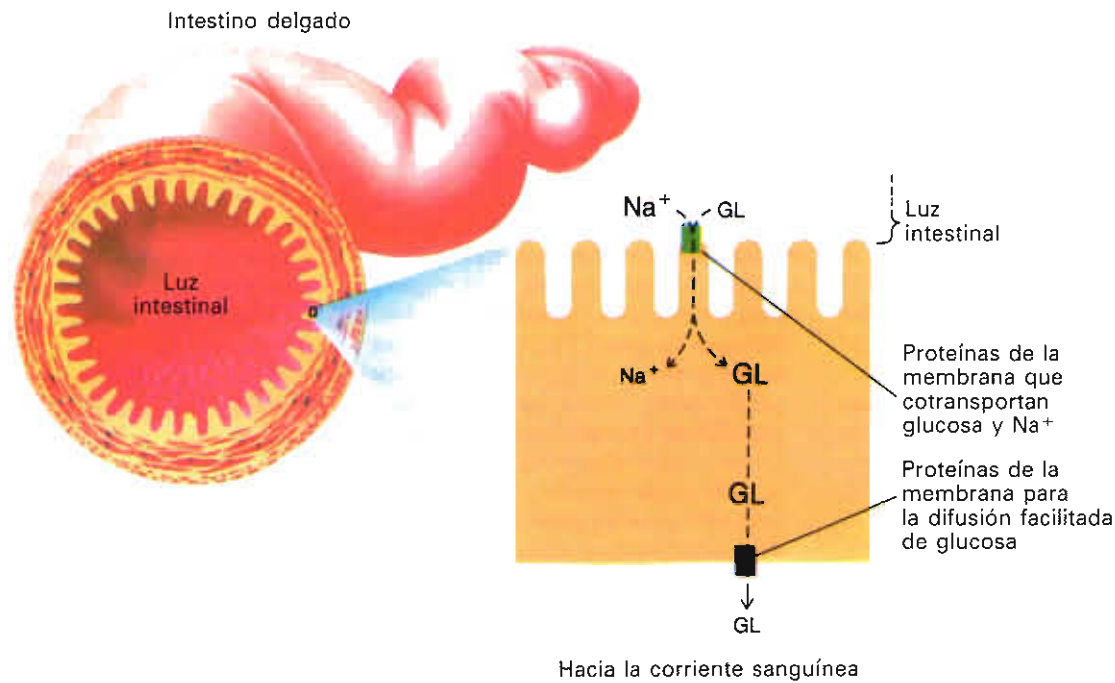


FIGURA 4-44. Transporte secundario: empleo de energía almacenada en un gradiente iónico. La ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ residente en la membrana plasmática de la superficie basal mantiene una concentración citoplásmica de Na^+ muy baja. El gradiente de Na^+ a través de la membrana plasmática representa un almacén de energía que puede liberarse para efectuar trabajo como en el cotransporte de glucosa por un sistema simporte de Na^+ -glucosa localizado en la membrana plasmática apical. Una vez transportadas a través de la superficie apical al interior de la célula, las moléculas de glucosa difunden a la superficie basal donde son llevadas por el transportador de glucosa, un sistema de difusión facilitada, al exterior de la célula y hacia el torrente sanguíneo. El tamaño relativo de GL y Na^+ indica la dirección de los respectivos gradientes de concentración.

través de la membrana plasmática apical siguiendo su gradiente de concentración es “controlada” por las células epiteliales que dirigen el cotransporte de moléculas de glucosa hacia adentro de la célula *contra* un gradiente de concentración. Se dice que las moléculas de glucosa son impulsadas por un sistema de transporte activo *secundario*.

En este caso, la proteína de transporte se enlaza tanto al sodio como a la glucosa en la superficie externa de la membrana plasmática apical. Cuando el ion sodio se libera en la célula dentro de una solución de menor concentración, la conformación de la proteína aparentemente cambia, de modo que pierde su afinidad por la molécula de glucosa, la cual entonces es liberada dentro de la célula. Una vez adentro, las moléculas de glucosa difunden por toda la célula y se desplazan a través de la membrana basal mediante difusión facilitada.

El transporte activo secundario de glucosa al interior de las células epiteliales del intestino (y al interior de las células que revisten los túbulos del riñón mediante un sistema similar) es un ejemplo de **simporte**, en el cual las dos especies transportadas (Na^+ y glucosa) se mueven en la misma dirección. Se han aislado numerosas proteínas de transporte secundario que participan en **antipuerto**, en el cual las dos especies transportadas se mueven en direcciones opuestas (véase la fig. 5-28 como ejemplo). Gran número de células conservan el pH citoplásmico apropiado aco-

plando el movimiento hacia adentro del Na^+ con el movimiento hacia fuera del H^+ .

4-6 Potenciales de membrana e impulsos nerviosos

Todos los organismos responden a los estímulos externos, propiedad conocida como *irritabilidad*. Incluso cuando se pica a una ameba unicelular con una fina aguja de vidrio, responde retirando sus pseudópodos y adopta forma esférica, desplazándose en otra dirección. Investigaciones acerca de la base subyacente a la irritabilidad han demostrado que su origen reside en actividades dentro de la membrana plasmática de células excitables. Se cree que la irritabilidad de una ameba depende de las mismas propiedades básicas de la membrana que conducen a la generación y propagación de impulsos nerviosos, tema que se trata en lo que resta de este capítulo.

Cuando hay separación de cargas opuestas entre dos puntos, como el interior y el exterior de la membrana plasmática, se genera una diferencia de voltaje o potencial eléctrico entre dichos puntos. El voltaje a través de la membrana plasmática se puede medir introduciendo un fino electrodo de vidrio en el citoplasma de una célula, colocando otro electrodo en el líquido extracelular fuera de la célula y

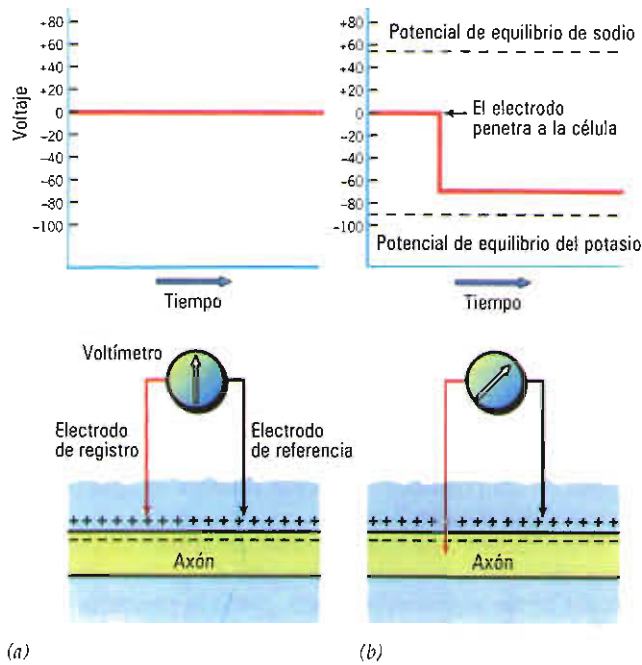


FIGURA 4-45. Medición del potencial de reposo de una membrana. El potencial se mide al determinar una diferencia de cargas entre los electrodos de referencia y de registro. a) Ambos electrodos se sitúan fuera de la célula y no se mide diferencia de potencial (voltaje). b) Conforme el electrodo penetra en la membrana plasmática del axón, el potencial cae de inmediato a -70 mV (interior negativo), lo cual se aproxima al potencial de equilibrio para iones potasio, o sea, el potencial que resultaría si la membrana fuera impermeable a todos los iones, excepto al potasio.

conectando ambos electrodos a un voltímetro, instrumento capaz de medir la diferencia de carga entre dos puntos (fig. 4-45). Cuando se realizó por primera vez este experimento en un axón gigante de calamar, se registró una diferencia de potencial de casi 70 milivoltios (mV), siendo el interior negativo respecto del exterior (indicado con signo menos, -70 mV). El potencial eléctrico no es exclusivo de las células nerviosas; ocurre en todo tipo de célula y su magnitud varía entre -15 y -100 mV. Para células no excitables, o sea, diferentes de células nerviosas y musculares, este voltaje simplemente se llama **potencial de membrana**. En la célula nerviosa o muscular, este mismo potencial se denomina **potencial de reposo**, sujeto a un cambio espectacular, como analizaremos en la siguiente sección.

La magnitud y dirección del voltaje a través de la membrana plasmática se determina por la capacidad relativa de diferentes iones para desplazarse de un lado al otro de la membrana. Como se describió al principio del capítulo, la ATPasa de Na^+/K^+ bombea Na^+ fuera de la célula y K^+ al interior de la misma, y por lo tanto establece un pronunciado gradiente de estos iones a través de la membrana plasmática. Como resultado de su gradiente de concentración, podría esperarse que los iones potasio salieran de la célula y los iones sodio entraran a la misma. Sin embargo, la mayor parte de los canales iónicos abiertos en la membrana plasmática de una célula nerviosa *en reposo* son selec-

tivos para K^+ y con frecuencia se les denomina *canales para escurrimiento de K^+* . Utilizando la siguiente ecuación³ se puede calcular el potencial de membrana (E_K) que pudiera medirse en el equilibrio si la membrana plasmática de una célula nerviosa sólo fuera permeable a K^+ .

$$E_K = 2.303 \frac{RT}{zF} \cdot \log_{10} \frac{[\text{K}^+]_o}{[\text{K}^+]_i}$$

Para un axón gigante de calamar, la $[\text{K}^+]_i$ interna es de casi 350 mM, en tanto que la $[\text{K}^+]_o$ externa es de unos 10 mM; por lo tanto, a 25°C (298°K) y $z = +1$ (para el ion K^+ univalente)

$$E_K = 59 \log_{10} 0.028 = -91 \text{ mV}$$

(Un cálculo similar para el potencial de equilibrio de Na^+ produciría un valor aproximado de $+55$ mV.) Puesto que las mediciones de voltaje a través de la membrana de un nervio en reposo son similares en signo y magnitud (-70 mV) al potencial de equilibrio del potasio que acabamos de calcular, se presume que el movimiento de iones potasio a través de la membrana es el factor más importante para determinar el potencial de reposo. La diferencia entre el potencial de equilibrio calculado para K^+ (-91 mV) y el potencial de reposo medido (-70 mV, fig. 4-45) se debe a una ligera permeabilidad de la membrana al Na^+ y al Cl^- .

Potencial de acción

Según se mencionó, los fisiólogos observaron por primera vez el potencial de membrana en el decenio de 1930 a partir de estudios sobre axones gigantes del calamar. Estos axones, que tienen aproximadamente 1 mm de diámetro, conducen impulsos a velocidad elevada, lo que permite al calamar escapar con rapidez de sus predadores. Cuando se estimula la membrana en reposo de un axón de calamar mediante piquetes con una aguja fina o sacudidas con una corriente eléctrica de muy baja intensidad, el axón responde abriendo la compuerta de algunos canales de sodio y permite que penetren a la célula un número limitado de iones sodio. Este movimiento de cargas positivas al interior reduce el potencial de membrana, que se vuelve menos negativo. Al reducirse el voltaje *disminuye* la polaridad entre los dos lados de la membrana, lo que se denomina **despolarización**.

Si el estímulo sólo despolariza la membrana unos pocos milivoltios, por ejemplo -70 a -60 mV, la membrana rápidamente vuelve a su potencial de reposo tan pronto como cesa el estímulo (fig. 4-46, recuadro izquierdo). Sin embargo, cuando el estímulo es bastante intenso, la membrana se despolariza más allá de cierto punto, llamado **umbral**, situado cerca de -50 mV. Cuando esto ocurre, se desencadena una nueva serie de acontecimientos. El cambio de voltaje provoca que las compuertas de los canales de sodio operados por voltaje se abran y los iones de sodio

³ Esta ecuación, llamada ecuación de Nernst, se deriva de la ecuación planteada en la página 142, fijando ΔG como cero, que es el caso cuando los iones en movimiento están en equilibrio.

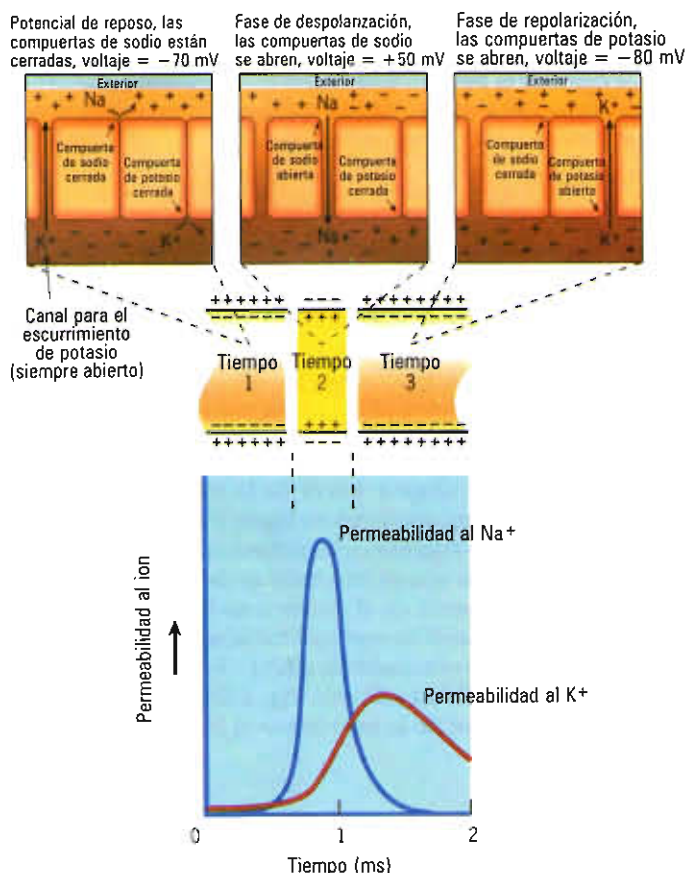


FIGURA 4-46. Generación de un potencial de acción. *Tiempo 1*, recuadro superior izquierdo: en esta región del nervio, la membrana celular muestra el potencial de reposo en el cual sólo los canales para escurrimiento de K^+ están abiertos y el voltaje de la membrana se aproxima a -70 mV. *Tiempo 2*, recuadro superior central: la membrana se ha despolarizado más allá del valor umbral, lo que provoca la apertura de las compuertas de sodio reguladas por voltaje que causan un flujo de Na^+ hacia adentro (indicado por el cambio de permeabilidad en la parte inferior del dibujo). El incremento de permeabilidad al Na^+ provoca que el voltaje de la membrana se invierta transitoriamente y alcance un valor de casi $+50$ mV (*tiempo 2*). Esta inversión del potencial de membrana es lo que constituye el potencial de acción. *Tiempo 3*, recuadro superior derecho: en una breve fracción de segundo la compuerta de sodio se cierra y se abren ahora las compuertas de potasio, lo que permite que el ion potasio difunda a través de la membrana (parte inferior del dibujo) y se establezca en ese sitio un potencial incluso más negativo (-80 mV) que el potencial de reposo. Casi tan pronto como se abren, las compuertas de potasio se vuelven a cerrar y sólo permanecen abiertos los canales para escurrimiento de potasio, como guía primaria para el movimiento de iones a través de la membrana y el restablecimiento del potencial de reposo.

difundan al interior de la célula (fig. 4-46, recuadro central) siguiendo sus gradientes de concentración y eléctricos. Como resultado del ingreso de Na^+ a través de los canales de Na^+ , el potencial de membrana se invierte brevemente (fig. 4-46) y llega a ser un potencial positivo de casi $+50$ mV, que se aproxima al potencial de equilibrio para Na^+ (fig. 4-45).

Luego de 1 mseg, aproximadamente, los canales de sodio se cierran en forma espontánea e impiden mayor flujo

hacia adentro de Na^+ y los canales de potasio operados por voltaje se abren (fig. 4-46, recuadro derecho). Como resultado, los iones potasio fluyen al exterior de la célula siguiendo su gradiente electroquímico y el potencial de membrana vuelve al valor negativo cercano al potencial de equilibrio de K^+ (fig. 4-46). El potencial de membrana negativo provoca que los canales de potasio operados por voltaje se cierren, dejando abiertos sólo los canales por donde escurre K^+ , que retornan la membrana a su potencial de reposo. En conjunto, estos cambios del potencial de membrana se denominan **potencial de acción**. Toda la serie de cambios durante un potencial de acción apenas dura 5 mseg en el axón de calamar y menos aún en la célula nerviosa mielinizada de un mamífero. Como los canales de sodio no pueden reabrirse durante algunos milisegundos después de que se cierran, la membrana entra en un breve *periodo refractario* después de un potencial de acción durante el cual no responde a nuevos estímulos.

El movimiento de iones a través de la membrana plasmática de células nerviosas es parte de la comunicación neural. Ciertos anestésicos *locales*, como la procaina (o novocaína), actúan cerrando las compuertas de los canales iónicos en la membrana de células nerviosas y sensoriales. En tanto estos canales iónicos permanezcan cerrados, las células afectadas son incapaces de generar potenciales de acción y por lo tanto no pueden informar al cerebro lo que ocurre en la piel o en los dientes.

Es digno de notar que cuando la membrana de una neurona se despolariza hasta su valor umbral, se dispara un potencial de acción "completo" sin estimulación adicional. Esta característica funcional de la célula nerviosa se conoce como **ley de todo o nada**. No hay intermedios; la despolarización subumbral es incapaz de desencadenar un potencial de acción, en tanto que la despolarización umbral automáticamente provoca una respuesta máxima. También debe subrayarse que un potencial de acción no es un proceso que requiera energía, sino que es resultado del flujo de iones que siguen sus respectivos gradientes electroquímicos. La célula requiere energía para generar los pronunciados gradientes iónicos a través de la membrana plasmática, pero una vez establecidos, los diferentes iones fluyen a través de la membrana tan pronto como se abren sus respectivas compuertas.

Propagación del potencial de acción en forma de impulso

Hasta este punto hemos restringido el análisis a hechos que ocurren en un sitio particular de la membrana de la célula nerviosa, donde una despolarización experimental desencadena un potencial de acción. Una vez iniciado el potencial de acción no permanece localizado en un sitio particular, sino que se *propaga* a lo largo de la célula en forma de **impulso nervioso**. En condiciones normales, el potencial de acción se inicia en un extremo de la célula nerviosa (en el punto donde surge el axón del cuerpo celular) y desde allí se desplaza hacia el extremo opuesto de la célula. En condiciones experimentales, como las que acabamos de describir, el potencial de acción se dispara en alguna parte a la mitad

de la neurona y desde ese sitio se desplaza en ambas direcciones.

Los impulsos nerviosos se propagan a lo largo de una membrana debido a que el potencial de acción generado en un sitio tiene efecto en el sitio adyacente. La gran despolarización que acompaña a un potencial de acción arrastra iones positivos hacia ese sitio sobre la superficie externa de la membrana y los aleja de dicho sitio sobre la superficie interna (fig. 4-47). Como consecuencia de este flujo de corriente, la membrana también se despolariza en la región situada justo por delante del potencial de acción. Puesto que la despolarización que acompaña al potencial de acción es muy grande, la membrana de la región adyacente se despolariza con rapidez hasta un nivel más allá del valor umbral y las compuertas de sodio se abren en este nuevo sitio generando otro potencial de acción. Así, una vez desencadenado un potencial de acción, todo el trayecto de la neurona será recorrido por una onda de potenciales de acción, que sin perder nada de intensidad llega a su célula específica con igual intensidad a la del punto de origen.

Aunque el potencial de acción implica un cambio espectacular en el voltaje de membrana, sólo un mínimo porcentaje de los iones del axón participan en cualquier impulso determinado. Aunque la ATPasa de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ se inactiva, con frecuencia la neurona continúa generando miles de impulsos antes que se disipen los gradientes iónicos originalmente establecidos por la actividad de la bomba.

Lo esencial es la rapidez

Cuanto mayor sea el diámetro de un axón menor será la resistencia al flujo de corriente local y un potencial de acción en un sitio con mayor rapidez puede activar regiones adyacentes de la membrana. Los invertebrados sacan el mayor provecho de esta relación desarrollando axones gigantes que facilitan el escape del animal cuando encuentra algún peligro. Sin embargo, hay un límite a este enfoque evolutivo. Puesto que la velocidad de conducción aumenta con la raíz cuadrada del incremento de diámetro, un axón con $480 \mu\text{m}$ de diámetro sólo puede conducir un

potencial de acción cuatro veces más rápido que uno que tenga $30 \mu\text{m}$ de diámetro.

En la evolución de los vertebrados, el aumento de la velocidad de conducción se logró envolviendo el axón en una vaina de mielina formada por células accesorias denominadas células de Schwann (fig. 4-48, a). La vaina de mielina, compuesta casi exclusivamente por membranas que contienen lípidos, es ideal para prevenir el paso de iones a través de la membrana plasmática. Como resultado, los potenciales de acción sólo pueden ocurrir en hendiduras descubiertas, o nódulos de Ranvier, entre las células de Schwann adyacentes que constituyen la vaina (fig. 4-48, a). Un potencial de acción en un nódulo desencadena otro potencial de acción en el siguiente nódulo (fig. 4-48, b), y

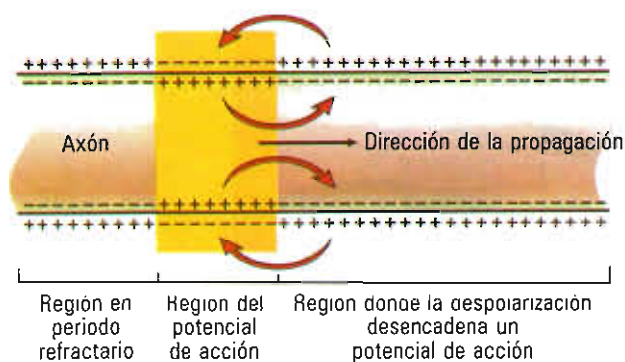


FIGURA 4-47. La propagación de un impulso ocurre como resultado del flujo local de iones. Un potencial de acción en un sitio de la membrana despolariza la región adyacente de dicha membrana y desencadena un segundo potencial de acción en ese sitio. El potencial de acción sólo puede avanzar hacia adelante debido a que la porción de la membrana que acaba de experimentar un potencial de acción permanece en periodo refractario.

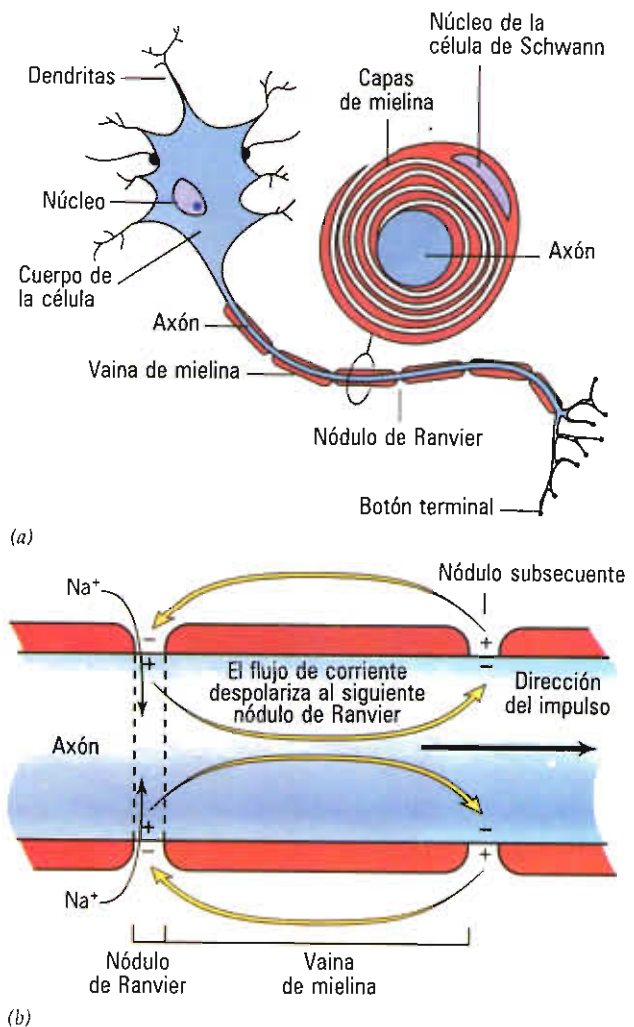


FIGURA 4-48. Conducción saltatoria. a) Esquema de una neurona con su axón mielinizado que muestra los nódulos de Ranvier: sitios donde el axón carece de la envoltura de mielina. El recuadro muestra la vaina de mielina compuesta de células de Schwann individuales enrolladas alrededor del axón. b) Durante la conducción saltatoria, sólo la membrana de la región nodal del axón se despolariza y es capaz de generar un potencial de acción. Esto se logra conforme la corriente fluye directamente desde un nódulo activado al siguiente nódulo en reposo a lo largo del axón.

por lo tanto el impulso al viaje de nódulo en nódulo sin necesidad de activar la membrana interpuesta. La propagación de un impulso por este mecanismo se denomina **conducción saltatoria**. Los impulsos conducidos a lo largo de un axón mielinizado alcanzan velocidades de hasta de 120 metros por segundo, casi 20 veces más rápida que la velocidad de los impulsos en una neurona no mielinizada del mismo diámetro.

La importancia de la mielinización se ilustra notablemente en la esclerosis múltiple, enfermedad producida por el deterioro gradual de la vaina de mielina que rodea los axones en diferentes partes del sistema nervioso. Las manifestaciones de la enfermedad de ordinario se inician en el adulto joven; las víctimas experimentan debilidad en las manos, dificultad para caminar o problemas de la vista. El padecimiento se caracteriza por disfunción muscular progresiva y casi siempre culmina en parálisis permanente.

Neurotransmisión: salto de la hendidura sináptica

Las neuronas se unen con sus células específicas en sitios especializados denominados **sinapsis**. El examen cuidadoso de una sinapsis revela que las dos células no entran en contacto directo, sino que están separadas entre sí por una estrecha abertura de casi 20 a 40 nm. Esta abertura se denomina **hendidura sináptica**. Una *célula presináptica* (siempre una neurona) conduce impulsos hacia la sinapsis, y una *célula postsináptica* (ya sea célula nerviosa, muscular o glandular) siempre se sitúa en el "lado receptor" de una sinapsis. La figura 4-49 muestra algunas sinapsis entre las ramas terminales de un axón y una célula de músculo esquelético; la sinapsis de este tipo se denomina **unión neuromuscular** o **placa motora terminal**.

¿Cómo puede el impulso de una neurona presináptica "saltar" a través de la hendidura sináptica y afectar a la

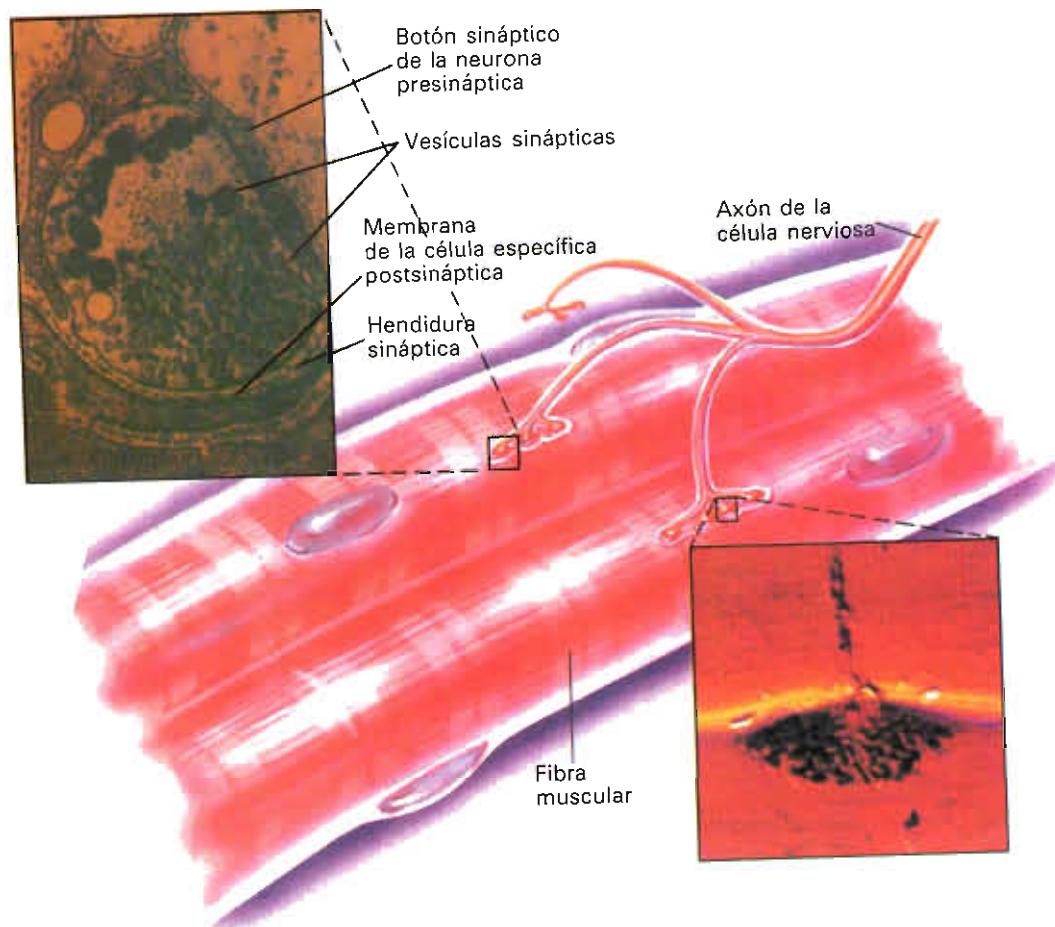
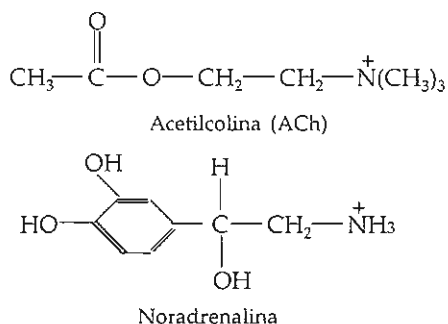


FIGURA 4-49. La unión neuromuscular es un sitio donde las ramificaciones terminales de un axón motor establecen sinapsis con las fibras musculares del músculo esquelético. El recuadro a la izquierda muestra las vesículas sinápticas residentes dentro del botón terminal del axón y la estrecha hendidura sináptica entre el botón terminal y la célula específica. El recuadro de la derecha muestra el botón terminal oprimido estrechamente contra la membrana plasmática de la célula muscular. (Según Vu/T. Reese y D.W. Fawcett/Visuals Unlimited; (recuadro) cortesía de Lennart Nilsson.)

célula postsináptica? Estudios efectuados hace varios decenios indicaron la participación de una sustancia química en la transmisión de un impulso de una célula a otra (fig. 4-50). El examen de las ramificaciones terminales de un axón (*botones terminales*) mediante microscopio electrónico muestra que contienen gran número de **vesículas sinápticas** (fig. 4-49, recuadro izquierdo) que almacenan moléculas del transmisor químico que actúa en las células postsinápticas adyacentes. Dos de los **neurotransmisores** mejor estudiados son acetilcolina y noradrenalina,



que transmiten impulsos a los músculos cardíaco y esquelético.

La secuencia de acontecimientos que ocurre durante la transmisión sináptica se puede resumir de la manera siguiente (fig. 4-50). Cuando un impulso alcanza un botón terminal (paso 1, fig. 4-50), la despolarización acompañante induce la abertura de canales Ca^{2+} operados por voltaje en

la membrana plasmática de esta porción de la célula nerviosa presináptica (paso 2, fig. 4-50). Normalmente, dentro de la neurona, igual que en todas las células, se encuentran concentraciones muy bajas de ion calcio. Cuando se abren las compuertas, los iones de calcio difunden desde el líquido extracelular al interior del botón terminal de la neurona, donde provocan la fusión de algunas membranas vesiculares sinápticas con la membrana plasmática subyacente, liberando moléculas del neurotransmisor en la hendidura sináptica (paso 3, fig. 4-50). (La fusión de las vesículas citoplásmicas con la membrana plasmática se estudia en la sección 8-4.)

Una vez liberadas de las vesículas sinápticas, las moléculas del neurotransmisor difunden a través de la estrecha abertura y se enlazan selectivamente a moléculas receptoras presentes en la membrana de la célula postsináptica (paso 4, fig. 4-50). Una molécula de neurotransmisor puede tener uno de dos efectos opuestos según el tipo de receptor sobre las membranas de la célula específica a la cual se enlaza.

1. El enlace del neurotransmisor puede inducir la abertura de canales catiónicos en la membrana provocando flujo de iones sodio al interior de la célula con la consecuente disminución del potencial de membrana. La despolarización de la membrana postsináptica *excita* a la célula y aumenta la posibilidad de que responda generando un potencial de acción (fig. 4-50, pasos 5a y 6).
2. El enlace del transmisor puede abrir canales de K^+ , lo que provoca la salida de iones potasio de la célula, o la

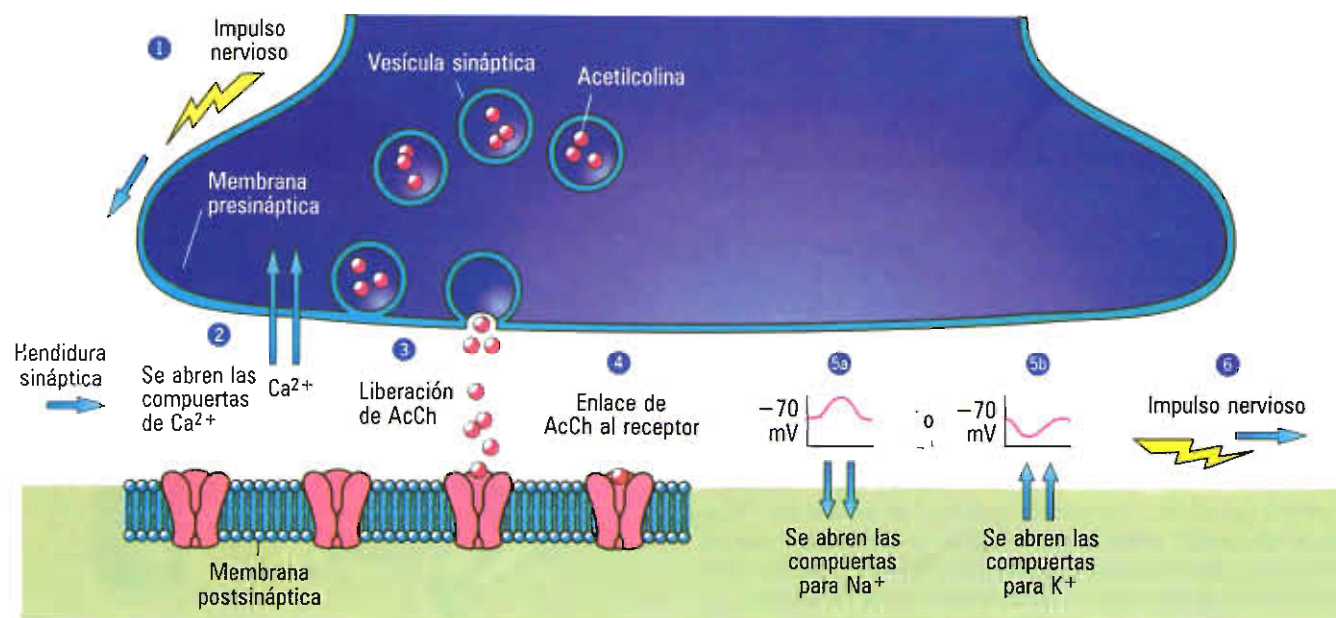


FIGURA 4-50. Secuencia de acontecimientos durante la transmisión sináptica cuando el neurotransmisor es acetilcolina. Durante los pasos 1-4, un impulso nervioso alcanza el botón terminal del axón, las compuertas de calcio se abren y provocan flujo de Ca^{2+} hacia adentro, se libera acetilcolina de las vesículas sinápticas y se enlaza a los receptores situados en la membrana postsináptica. Si el enlace de las moléculas del neurotransmisor provoca despolarización de la membrana presináptica (como en 5a), se puede generar un impulso nervioso en ese punto (6). Sin embargo, si se provoca hiperpolarización en la membrana presináptica (5b), la célula específica se inhibe y es más difícil generar un impulso en dicha célula por otro estímulo excitatorio. No se muestra el desdoblamiento del neurotransmisor por acetilcolinesterasa.

apertura de canales Cl^- , causando flujo de iones cloro al interior de la célula. El movimiento de estos iones incrementa la negatividad en el lado interno de la membrana, y por lo tanto crece el potencial de membrana (hiperpolarización). La hiperpolarización de la membrana postsináptica *inhibe* a la célula y reduce la probabilidad de generar un potencial de acción (fig. 4-50, paso 5b).

Todos los botones terminales de determinada neurona liberan la misma sustancia neurotransmisora, aunque dicha molécula puede tener efecto estimulador sobre una membrana postsináptica particular y efecto inhibitor sobre otra. Por ejemplo, la acetilcolina inhibe la contractilidad del

corazón, pero estimula la contractilidad del músculo esquelético. La estructura del receptor de acetilcolina y su función como canal iónico operado por ligandos se analiza con detalle en *La vía experimental*.

La vida media de un neurotransmisor después de ser liberado por una neurona presináptica debe ser corta, porque de otra manera el efecto de la sustancia se prolonga y la neurona postsináptica no se recuperaría. Esto se puede evitar de dos maneras: mediante enzimas que destruyen las moléculas del neurotransmisor en la hendidura sináptica o por proteínas que transportan las moléculas del neurotransmisor de regreso a la neurona que originalmente las liberó, proceso denominado *recaptación*. Debido a la destrucción o

LA VIA EXPERIMENTAL

El receptor para acetilcolina

En 1843, a la edad de 30 años, Claudio Bernard se mudó de un pequeño pueblo de Francia, donde era farmacéutico y aspirante a escritor de obras de teatro, a París, donde planeaba seguir su carrera literaria. En vez de ello, Bernard se inscribió en la escuela de medicina y llegó a ser el más notable fisiólogo del siglo XIX. Entre sus muchas áreas de interés se hallaba el mecanismo por el cual los nervios estimulaban la contracción del músculo esquelético. Sus estudios incluyeron el empleo del curare, un fármaco muy tóxico aislado de plantas tropicales y utilizado durante siglos por cazadores nativos de Sudamérica para fabricar flechas envenenadas. Bernard observó que el curare podía paralizar un músculo esquelético sin interferir con la capacidad de los nervios para conducir impulsos a dicho músculo o la capacidad del músculo para contraerse por estimulación directa. Bernard concluyó que el curare actuaba sobre alguna estructura situada en la región de contacto entre nervio y músculo.

Esta conclusión fue confirmada y ampliada por John Langley, fisiólogo de la Universidad de Cambridge. Langley estaba estudiando la capacidad de la nicotina, otra sustancia derivada de plantas, para estimular la contracción del músculo esquelético aislado de rana y el efecto del curare para inhibir la acción de la nicotina. En 1906, Langley concluyó que "el impulso nervioso no puede pasar de un nervio a un músculo por medio de una descarga eléctrica, sino por la secreción de una sustancia especial en el extremo del nervio".¹ También propuso que dicho "transmisor químico" se unía a una "sustancia receptora" sobre la superficie de la célula muscular, el mismo sitio donde se enlazan nicotina y curare. Posteriormente se demostró que estas proposiciones fueron proféticas.

La sugerencia de Langley de que el estímulo se transmite del nervio al músculo por una sustancia química fue confirmada en 1921 en un ingenioso experimento efectuado por el fisiólogo austriaco Otto Loewi, el diseño del cual vino a su mente durante un sueño. La frecuencia cardíaca de un vertebrado es

regulada por el equilibrio entre los impulsos de dos nervios de acción opuesta (antagonista). Loewi aisló el corazón de la rana junto con ambos nervios. La estimulación del nervio inhibitor (*vago*) liberó una sustancia química de la preparación de corazón a una solución salina que se permitió drenar hacia un segundo corazón aislado. La frecuencia del segundo corazón disminuyó de manera espectacular, como si su propio nervio inhibitor se hubiera activado.² Loewi llamó "Vagustoff" a la sustancia procedente del corazón de rana. En pocos años, Loewi demostró que las propiedades químicas y fisiológicas del Vagustoff eran idénticas a las de acetilcolina, y concluyó que la sustancia liberada en el extremo de las células nerviosas que constituyen el nervio vago era acetilcolina.

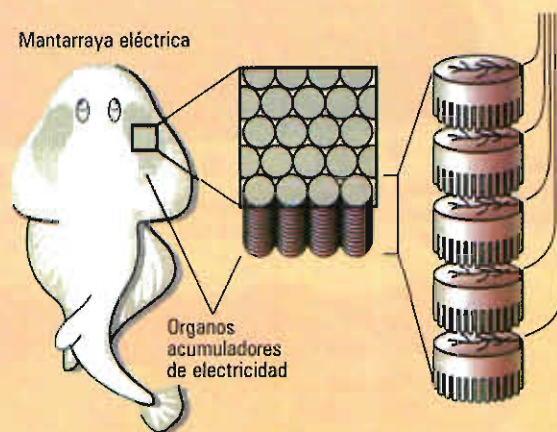


FIGURA VE 4-1. Los órganos eléctricos de *Torpedo* constan de pilas de uniones neuromusculares modificadas que se localizan a cada lado del cuerpo. (Según Z.W. Hall, *An Introduction to Neurobiology*, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. © 1992.)

la recaptación de las moléculas del neurotransmisor, el efecto de cada impulso no dura más de unos pocos milisegundos.

Las sinapsis son algo más que simples sitios de conexión entre neuronas adyacentes; son determinantes clave para orientar los impulsos a través del sistema nervioso. Los miles de millones de sinapsis presentes en el sistema nervioso de un mamífero complejo actúan como compuertas estáticas a lo largo de todas las diferentes vías, permitiendo que algunos segmentos de información codificada pasen de una neurona a otra en tanto que retienen otras piezas o las reorientan hacia otra dirección. Hay muchas otras razones para explicar la importancia que adquirió el estudio de las sinapsis en años recientes. Por ejemplo, los cambios en la

estructura y actividad de las sinapsis desempeñan un papel importante en aprendizaje y memoria. De manera similar, varias enfermedades del sistema nervioso, incluyendo miastenia grave, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia e incluso depresión, se cree que tienen sus raíces en el mal funcionamiento de las sinapsis.

Durante muchos decenios se pensó que el estudio de la transmisión sináptica implicaba un mecanismo de transferencia de información enteramente peculiar de las células nerviosas. En los últimos dos decenios, la investigación reveló que los mecanismos mediados por receptores y señales transmembrana controlan una gran variedad de procesos celulares (analizados en el capítulo 15).

En 1937, David Nachmanson, neurofisiólogo en la Sorbona, se encontraba de visita en la Feria Mundial de París, donde observó varias especies vivas del pescado eléctrico *Torpedo marmorata* que estaban en exhibición. Estas mantarrayas poseen órganos eléctricos capaces de producir fuertes descargas (40 a 60 voltios), que pueden matar a una posible presa. En aquel tiempo, Nachmanson estaba estudiando la enzima acetilcolinesterasa, que actúa para destruir la acetilcolina liberada en los extremos de nervios motores. Nachmanson se dio cuenta de que los órganos eléctricos de estos peces derivaban de tejido muscular esquelético modificado (fig. VE 4-1) y solicitó que le suministraran un par de peces para estudiar luego de concluida la Feria. Los resultados de sus primeros experimentos mostraron que el órgano eléctrico era una fuente extraordinariamente rica de acetilcolinesterasa.³ También contenía gran cantidad del receptor nicotínico para acetilcolina (nAChR),* el receptor presente en las membranas postsinápticas de las células musculares esqueléticas donde se unen las moléculas de acetilcolina liberadas de las fibrillas terminales del nervio motor. Encontró así un sistema "ideal" que demostró ser invaluable en el estudio de aspectos particulares de estructura y función de la célula. Como veremos en las siguientes páginas, los órganos eléctricos del pez fueron prácticamente el único material para estudiar el nAChR.

El nAChR es una proteína integral de la membrana, y no fue sino hasta el decenio de 1970 que se desarrollaron técnicas para aislar estas proteínas. Como se analizará en el capítulo 17, la purificación de una proteína particular requiere un procedimiento de ensayo adecuado capaz de determinar la cantidad presente de la proteína en cualquier fracción particular. El ensayo ideal para nAChR es un compuesto capaz de enlazarse de manera fuerte y selectiva a esta proteína particular. Este

compuesto fue descubierto en 1963 por Chen Yuan Lee y sus colaboradores de la Universidad Nacional de Taiwán. El compuesto es la α -bungarotoxina, sustancia presente en el veneno de una serpiente taiwanesa. La α -bungarotoxina provoca parálisis porque se enlaza fuertemente a los nAChR en la membrana postsináptica de la célula muscular esquelética y bloquea la respuesta del músculo a la acetilcolina.^{4,5}

Disponiendo de α -bungarotoxina marcada como sustancia de ensayo, órganos eléctricos como fuente y un detergente capaz de solubilizar las proteínas de la membrana, varios investigadores pudieron aislar los receptores para acetilcolina a principios de los años 1970. En uno de estos estudios,⁶ las membranas que contenían nAChR se aislaron homogenizando los órganos eléctricos en una licuadora y centrifugando la suspensión para formar pequeñas esferas con fragmentos de la membrana. Luego de probar varios procedimientos para solubilizar las proteínas de la membrana, se observó que el Tritón X-100 dio los mejores resultados. Tritón X-100 es un detergente no iónico. Igual que otros detergentes, Tritón X-100 posee una porción hidrófoba larga capaz de reubicar los fosfolípidos que normalmente rodean la porción hidrófoba de una proteína de membrana y un extremo hidrófilo hidrosoluble. A diferencia de la mayor parte de los detergentes, que poseen un grupo carboxilo con carga negativa, Tritón X-100 carece de carga neta (por lo tanto es no iónico) y daña menos la estructura de la proteína. Las proteínas de membrana se extrajeron de los fragmentos de membrana empleando el detergente Tritón X-100, y la mezcla se pasó a través de una columna que contenía pequeñas cuentas recubiertas con un compuesto sintético cuyo extremo posee semejanza estructural con acetilcolina (fig. VE 4-2, a). Conforme la mezcla de proteínas disueltas pasa a través de la columna, dos de las proteínas, nAChR y acetilcolinesterasa (AChE), con sitios de enlace para acetilcolina quedaron pegadas a las cuentas. El restante 90% de las proteínas del extracto no se enlazó a las cuentas, simplemente pasó a través de la columna y se recolectó (fig. VE 4-2, b). Luego de las proteínas, se pasó a través de la columna una solución 10^{-3} M de flaxedil que eliminó selectivamente los nAChR de las cuentas, dejando como residuo AChE. Con este procedimiento se purificó el receptor de acetilcolina cuantificado según su enlace a bungarotoxina, con un rendimiento mayor de 150 veces en un solo paso. Este tipo de procedimien-

* El receptor se describe como nicotínico debido a que la nicotina puede activarlo igual que la acetilcolina. Esto contrasta con los receptores muscarínicos para acetilcolina de la sinapsis de los nervios parasimpáticos, el cual puede activarse por muscarina, pero no por nicotina, e inhibirse con atropina, pero no con curare. Una persona cuyo cuerpo está acostumbrado a niveles altos de nicotina debido al hábito de fumar experimenta síntomas de abstinencia cuando deja de fumar, debido a que las neuronas postsinápticas que poseen nAChR ya no se estimulan a su nivel acostumbrado.

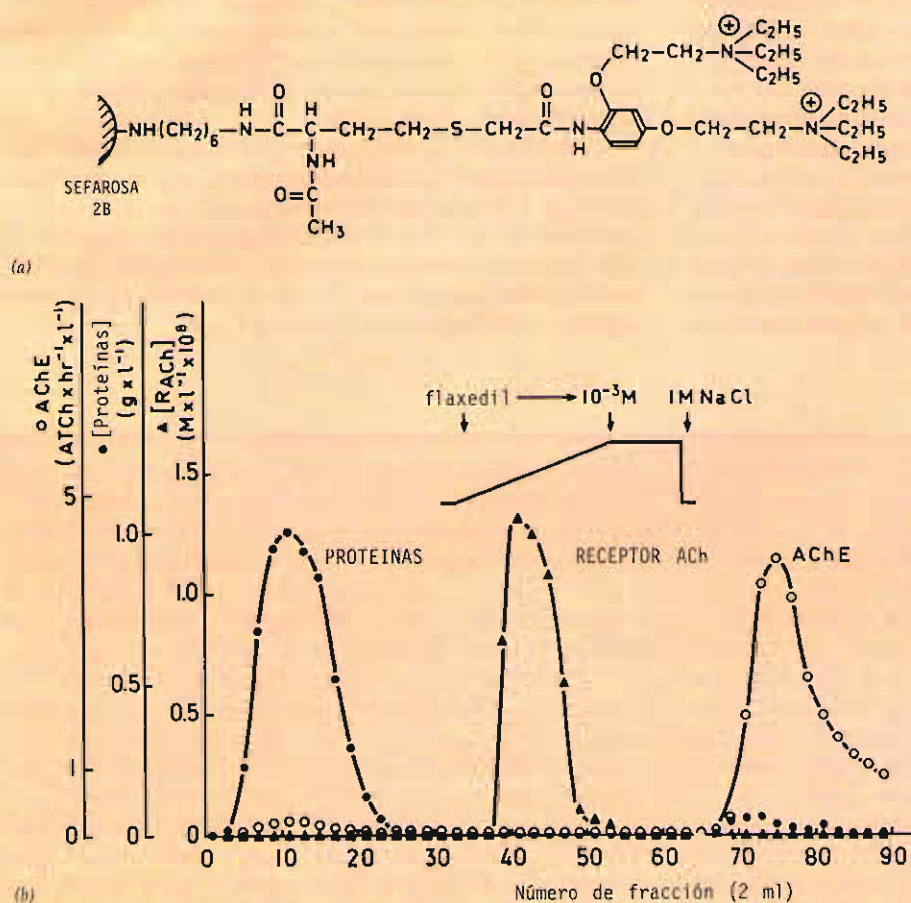


FIGURA VE 4-2. a) Estructura de un compuesto sintético CT5263 unido a cuentas de Sefarosa y empleado para formar una columna de afinidad. Los extremos del compuesto que sobresalen de las cuentas son similares a la acetilcolina y esto da lugar a que tanto la acetilcolinesterasa (AChE) como el receptor nicotínico para acetilcolina (nAChR) se unan a las cuentas. b) Pasos para aislar el nAChR. Cuando el extracto Tritón X-100 pasa a través de la columna, ambas proteínas enlazadas a la acetilcolina se fijan a las cuentas, en tanto que el resto de la proteína disuelta (casi 90% de la proteína total en el extracto) pasa directamente a través de la columna. El paso subsiguiente de una solución 10^{-3} M de flaxedil a través de la columna liberó el nAChR enlazado, sin alterar la AChE enlazada (que posteriormente se eluyó con una solución 1 M de NaCl). (Según R.W. Olsen, J.-C. Meunier y J.-P. Changeux, FEBS Lett. 28:99, 1972.)

to se conoce como *cromatografía por afinidad* y su empleo general se estudia en la sección 17-7.

El siguiente paso fue determinar con mayor precisión la estructura del receptor de acetilcolina. Los estudios efectuados en el laboratorio de Arthur Karlin, en la Universidad Columbia, determinaron que el receptor era un pentámero, una proteína que consta de cinco subunidades. Cada receptor contiene dos copias de una subunidad llamada α , y una copia de cada una de las subunidades β , γ y δ . Las subunidades se pueden distinguir extrayendo proteínas de la membrana en Tritón, purificando los nAChR mediante cromatografía por afinidad y luego sometiendo la proteína purificada a electroforesis a través de un gel de poliácridamida (EGPA-DSS, según se estudia en la sección 17-7) que separa los polipéptidos individuales según su tamaño, como se muestra en la figura VE 4-3.⁷

Otro punto importante en el estudio de los nAChR fue demostrar que el receptor purificado actúa tanto como sitio de enlace para acetilcolina como canal para el paso de cationes. Años antes, Jean-Pierre Changeux, del Instituto Pasteur en París, postuló que el enlace de acetilcolina al receptor provoca un cambio de conformación que abre un canal iónico dentro de la proteína. El flujo de iones Na^+ hacia el interior a través del canal despolariza la membrana y activa la célula muscular. En la última mitad del decenio de 1970, Changeux y sus cole-

gas lograron incorporar moléculas purificadas de nAChR en vesículas artificiales de lípidos.^{8,9} Empleando vesículas con diferentes concentraciones de iones sodio y potasio marcados, demostraron que el enlace de acetilcolina a receptores de la bicapa de lípidos inicia un flujo de cationes a través de la "membrana". Es evidente que "la proteína pura contiene todos los elementos estructurales necesarios para la transmisión química de la señal eléctrica; a saber: un sitio para enlace de acetilcolina, un canal iónico y un mecanismo para acoplar su actividad".

En el decenio de 1980, los investigadores se dedicaron a determinar la estructura del nAChR y el mecanismo por el cual se concentran en una pequeña porción de la membrana muscular, la porción adyacente a las fibrillas terminales de la neurona motora. El análisis de la estructura ha tomado diferentes caminos. Un método emplea genes purificados, determinación de las secuencias de aminoácidos y mutagénesis dirigida a un sitio para determinar las partes específicas de los polipéptidos que atraviesan la membrana, se unen al neurotransmisor o forman el canal iónico. Estos estudios acerca de la anatomía molecular de una proteína son similares en principio a los descritos en la página 147 para el canal iónico K^+ .

Otro método emplea microscopía electrónica. Las primeras imágenes del nAChR se observaron en micrografías elec-

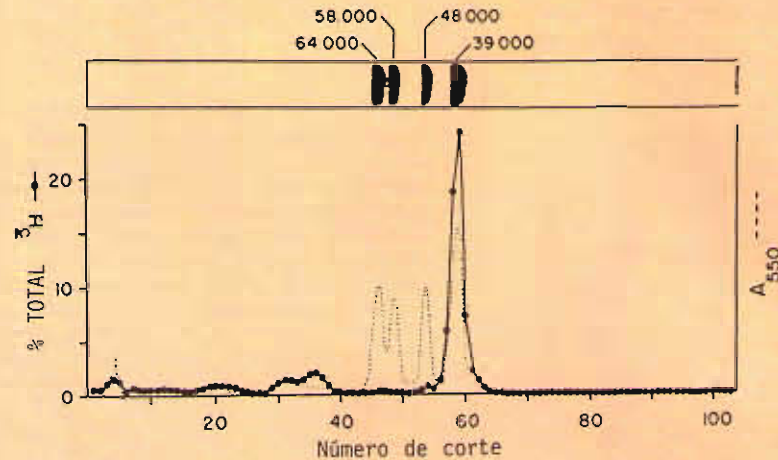


FIGURA VE 4-3. La parte superior de la figura muestra un gel de poliácridamida de dodecilsulfato de sodio luego de electroforesis de una preparación de nAChR purificada. Se observa que el receptor consta de cuatro subunidades diferentes cuyos pesos moleculares se indican. Antes de la electroforesis, la preparación de receptor purificado se incubó con un compuesto radiactivo (^3H -MBTA) parecido a la acetilcolina y que se enlaza al sitio de unión para acetilcolina del nAChR. Luego de la electroforesis se practicaron cortes de 1 mm en el gel y se determinó la radiactividad de cada rebanada. Toda la radiactividad se encontraba unida a la subunidad de 39 000 daltons, indicando que esta subunidad contiene el sitio de enlace para acetilcolina. La línea punteada indica la absorbancia de luz de cada fracción, la cual suministra una medida de la cantidad total de proteína presente en dicha fracción. La altura de los picos proporciona una medida de la cantidad relativa de cada una de las subunidades en la proteína. Todas las subunidades ocurren en igual cantidad, excepto la subunidad más pequeña (subunidad α , que contiene el sitio de enlace para ACh), de la cual hay un número doble de copias. (Según C.L. Weill, M.G. McNamee y A. Karlin, *Bioch. Biop. Res. Comm.* 61:1002, 1974.)

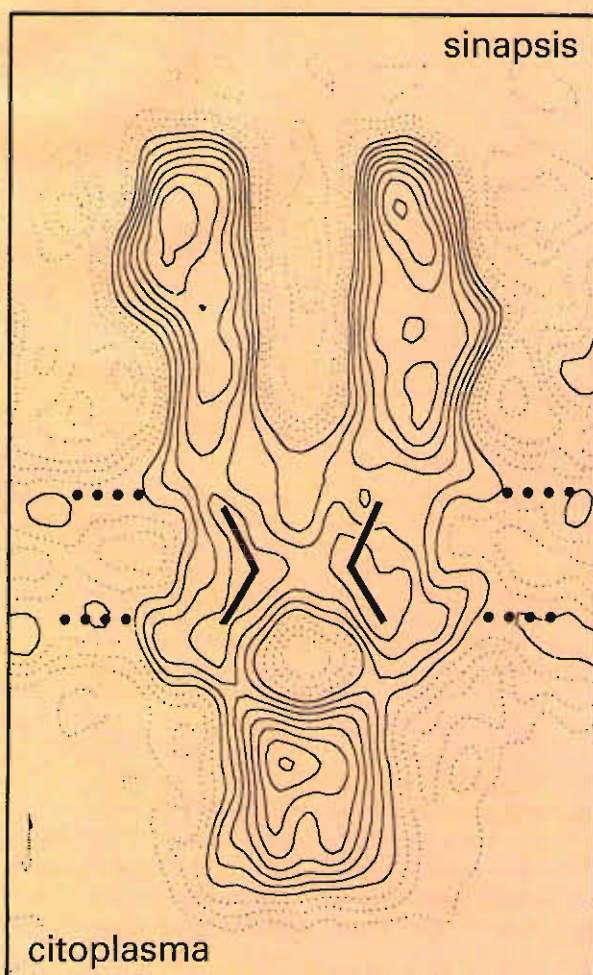
trónicas de la membrana de órganos eléctricos (fig. VE 4-4).¹⁰ Los receptores aparecen como estructuras anulares, no diferentes a donas, con un diámetro de 8 nm y una depresión central de 2 nm que sobresale de la bicapa de lípidos hacia el espacio externo. En los últimos años ha ido apareciendo una imagen cada vez más detallada del nAChR como resultado del trabajo de Nigel Unwin y sus colegas, del Medical Research Council of England.¹¹⁻¹² Utilizando un análisis matemático de micrografías electrónicas de membranas congeladas procedentes de órganos eléctricos, Unwin describió la disposición de las cinco subunidades que rodean al canal central (fig. VE 4-5). El canal iónico consta de un estrecho poro que atraviesa la bicapa rodeado por paredes que se extienden 6 nm hacia la hendidura sináptica sobre un lado de la membrana y 2 nm hacia el citoplasma por el otro lado. Se cree que una bolsa situada sobre el dominio externo de cada subunidad α corresponde a un sitio de enlace para acetilcolina. Esta descripción del nAChR se encuentra entre las mejores para cualquier proteína integral de la membrana de una célula eucariota.

Ya vimos cómo pueden disecarse las propiedades de un segmento particular de una proteína mediante la preparación de mutantes portadores de aminoácidos sustituidos específicamente. Otra manera para disecar funcionalmente una proteína es construir un gen que codifique parte de dos proteínas diferentes, introducir el gen en una célula huésped y permitir al gen que dirija la formación de una proteína híbrida (quimérica). Este método se utiliza para estudiar ciertas propiedades del nAChR. En estos experimentos¹³ se produjo una proteína quimérica funcional que contiene el dominio N-terminal del nAChR unido a los dominios transmembrana de un receptor diferente de la misma superfamilia: el receptor para 5-hidroxi-

triptamina (5HT₃). Las células que poseen este receptor quimérico generan una corriente como respuesta a la acetilcolina y no a 5HT₃, lo cual confirma la predicción de que el sitio de enlace para acetilcolina se sitúa en el dominio N-terminal de la proteína residente sobre la cara extracelular de la membrana.

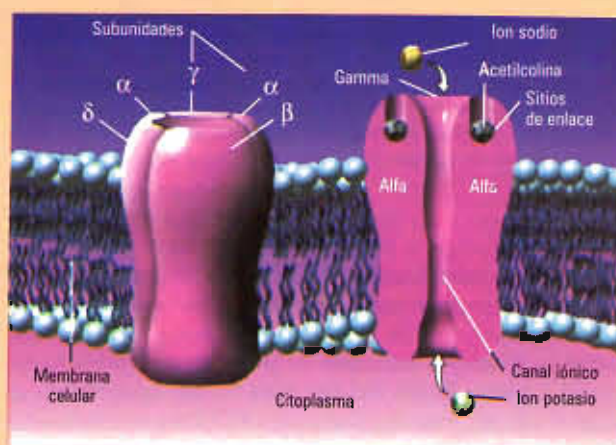


FIGURA VE 4-4. Micrografía electrónica de una membrana teñida en negativo rica en receptores procedente del órgano eléctrico de un pez eléctrico que muestra la densa disposición de las moléculas nAChR. (Según Werner Schiebler y Ferdinand Hucho, *Eur. J. Biochem.* 85:58, 1978.)



(a)

FIGURA 4-5. a) Mapa de densidad electrónica en un corte transversal del nAChR obtenido mediante análisis de la imagen al microscopio electrónico de los cristales tubulares de membranas del órgano eléctrico de *Torpedo* embebidas en hielo. Este análisis permite a los investigadores reproducir el aspecto tridimensional de una sola proteína nAChR que reside dentro de la membrana. El contorno continuo indica líneas de densidad similar mayores que las del agua. Las dos líneas oscuras en forma de barra representan hélices α que revisten el canal en su punto más estrecho. b) Esquema del nAChR que muestra la disposición de las subunidades y la representación de un corte transversal de la proteína. (Según P.N.T. Unwin, J. Mol. Biol. 229:1118, 1993; b; tomado de Chemical Signaling in the Brain, por J.-P. Changeux. © Noviembre 1993 por Scientific American, Inc. Todos los derechos reservados.)



(b)

El estudio también demuestra que el cambio de conformación que ocurre cuando la ACh se enlaza al receptor químico es capaz de abrir el poro que conduce al interior de un canal 5HT_3 ; esto sugiere que a pesar de diferencias mayores en las secuencias de aminoácidos, los dos canales operan por un mecanismo de compuerta de tipo similar.

En la página 137 vimos cómo el movimiento de las proteínas integrales de la membrana por lo general está restringido por otros componentes situados sobre la cara citoplásmica o extracelular de la membrana. Esta observación está particularmente bien ilustrada por el nAChR. Durante las primeras etapas del desarrollo de una célula del músculo esquelético, los receptores de acetilcolina pueden distribuirse más bien de manera uniforme a través de toda la membrana plasmática de la célula. Sin embargo, con la maduración de la célula muscular y la estrecha aproximación de las fibrillas terminales de la neurona motora, estas mismas moléculas receptoras se desplazan dentro de la membrana para concentrarse extremada-

mente en las regiones de la sinapsis que sólo representa una fracción muy pequeña de la superficie de la célula muscular. Se estima que más de 90% de las moléculas nAChR se concentran en menos de 0.1% de la membrana plasmática de la célula.

Probablemente haya varios factores que expliquen el agrupamiento espectacular de estas proteínas integrales en un ambiente lípido relativamente fluido, pero una proteína ha sido el tema de particular interés. En 1981 se demostró que el tratamiento con álcali (pH 11) de las membranas postsinápticas del tejido eléctrico de *Torpedo* produce la liberación de una proteína específica (peso molecular de 43 000 daltons) procedente de la cara interna de la membrana postsináptica. La liberación de esta proteína periférica interna se acompaña de una dispersión de las moléculas receptoras dentro de la membrana, como si la proteína 43K sirviera para anclar los receptores dentro de la región postsináptica.¹⁴

El papel de la proteína 43K como medio para fijar los nAChR se demostró de manera convincente en experimentos

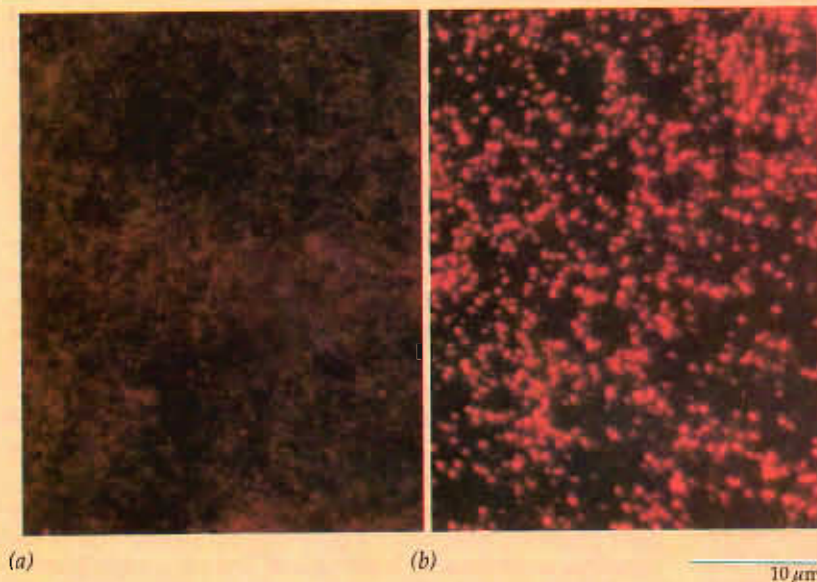


FIGURA VE 4-6. a) Se inyectaron oocitos con transcritos RNAm de ratón codificando todas las subunidades receptoras de nAChR y se determinó la distribución de las moléculas receptoras sobre la superficie del oocito mediante su enlace a α -bungarotoxina fluorescente marcada. b) Se siguió el mismo procedimiento que el descrito en a, excepto que junto con los transcritos para las subunidades receptoras se inyectaron transcritos RNAm para la proteína 43K. Sólo se observa agrupamiento del receptor sobre la superficie del oocito cuando se inyecta conjuntamente RNAm que codifica la proteína 43K y RNAm que codifica las subunidades receptoras. (Según Stanley C. Froehner y cols. *Neuron* 5:404, 1990; con permiso de Cell Press.)

en los cuales se inyectan oocitos de anfibios.¹⁵ Cuando se inyecta RNA mensajero que sólo codifica las subunidades nAChR dentro de un oocito, el RNAm se traduce al receptor, el cual se incorpora a la membrana plasmática del oocito. Cuando subsiguientemente se tratan estas células con bungarotoxina marcada, se observa que la toxina se enlaza de manera uniforme a la superficie de la célula, lo que indica la distribución pareja del nAChR dentro de la membrana plasmática (fig. VE 4-6, a). Por lo contrario, si el RNAm para las subunidades nAChR se inyecta conjuntamente con RNAm que codifique la proteína 43K, los receptores ya no se distribuyen uniformemente en la membrana, sino que aparecen en agrupamientos (fig. VE 4-6, b). Estos agrupamientos también contienen la proteína 43K sobre la superficie interna de la membrana. La proteína 43K tal vez desempeñe un papel importante en causar el agrupamiento de las moléculas nAChR durante la formación de la sinapsis neuromuscular en el embrión y la fijación de las moléculas del receptor en esas sinapsis a partir de entonces. También se ha implicado a una segunda proteína denominada agrina como factor fijador de los nAChR a la membrana sináptica.^{revisada en 16}

BIBLIOGRAFIA

1. Langley, J.N. 1906. On nerve endings and on special excitable substances in cells. *Proc. Roy. Soc. Lond.* 78:170-194.
2. Loewi, O. 1921. Über humorale übertragbarkeit der herznervwirkung. *Pflüger's Arch.* 214:239-242. (A review of Loewi's work written by him in English can be found in *Harvey Lects.* 28:218-233, 1933.)
3. Marnay, A. 1937. Cholinesterase dans l'organe électrique de la torpille. *Compte Rend.* 126:573-574. (A review of Nachmansson's work written in English can be found in his book entitled *Chemical and Molecular Basis of Nerve Action*, 2a. edición, Academic Press, 1975.)
4. Chang, C.C. y Lee, C.Y. 1963. Isolation of the neurotoxins from the venom of *Bungarus multicinctus* and their modes of neuromuscular blocking action. *Archs. Int. Pharmac. Ther.* 144:241-257.
5. Lee, C.Y. y Tseng, L.F. 1966. Distribution of *Bungarus multicinctus* venom following envenomation. *Toxicon* 3:281-290.
6. Olsen, R.W., Meunier, J.C., y Changeux, J.P. 1972. Progress in the purification of the cholinergic receptor protein from *Electrophorus electricus* by affinity chromatography. *FEBS Letters* 28:96-100.
7. Weill, C.L., McNamee, M.G. y Karlin, A. 1974. Affinity-labeling of purified acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Biochem. Res. Comm.* 61:997-1003.
8. Hazelbauer, G.L. y Changeux, J.P. 1974. Reconstitution of a chemically excitable membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71:1479-1483.
9. Popot, J.L., Cartaud, J. y Changeux, J.P. 1981. Reconstitution of a functional acetylcholine receptor. *Eur. J. Biochem.* 118:203-214.
10. Schiebler, W. y Hucho, F. 1978. Membrane rich in acetylcholine receptor: Characterization and reconstitution to excitable membrane from exogenous lipids. *Eur. J. Biochem.* 85:55-63.
11. Brisson, A. y Unwin, N. 1984. Tubular crystals of acetylcholine receptor. *J. Cell Biol.* 99:1202-1211.
12. Unwin, N. 1993. Acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 229:1101-1124.
13. Eisele, J.-L., y cols. 1993. Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature* 366:479-483.
14. Cartaud, J. y cols. 1981. Consequences of alkaline treatment for the ultrastructure of the acetylcholine-receptor-rich membranes from *Torpedo marmorata* electric organ. *J. Cell Biol.* 90:418-426.
15. Froehner, S.C. y cols. 1990. The postsynaptic 43K protein clusters muscle nicotinic acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 5:403-410.
16. Hoch, W., Campanelli, J.T. y Scheller, R.H. 1994. Agrin-induced clustering of acetylcholine receptors: A cytoskeletal link. *J. Cell Biol.* 126:1-4.

SINOPSIS

Las membranas plasmáticas son estructuras delicadas notablemente delgadas, pero desempeñan un papel clave en muchas de las funciones más importantes de la célula. La membrana plasmática separa la célula viviente de su entorno; suministra una barrera selectivamente permeable que permite intercambiar ciertas sustancias, en tanto que evita el paso de otras; contiene el mecanismo que físicamente transporta sustancias de un lado al otro de la membrana; también contiene receptores que se unen a ligandos específicos en el espacio externo y transmiten información de los compartimientos internos de la célula; media interacciones con otras células; suministra un armazón en el cual se pueden organizar componentes; es un sitio transductor de energía de un tipo a otro (p. 116).

Las membranas son ensamblados de lípidos y proteínas en los cuales los componentes se mantienen reunidos en una delgada capa por enlaces no covalentes. La membrana se mantiene unida en una lámina mediante una bicapa de lípidos que consta de una capa bimolecular de lípidos anfipáticos cuyos grupos polares enfrentan el exterior y colas lípidas acil hidrófobas enfrentadas al interior. Entre los lípidos se incluyen fosfoglicéridos, como fosfatidilcolina; lípidos a base de esfingosina, como el fosfolípido esfingomielina, y cerebrósidos que contienen carbohidratos y gangliósidos (glucolípidos), y colesterol. Las proteínas de la membrana se pueden dividir en tres grupos: proteínas integrales que penetran y atraviesan la bicapa de lípidos con porciones expuestas sobre ambas superficies de la membrana: citoplásmica y extracelular; proteínas periféricas presentes por completo en el lado externo de la bicapa de lípidos, pero unidas mediante enlaces no covalentes con los grupos polares de la bicapa de lípidos o con la superficie de una proteína integral; y proteínas ancladas a los lípidos externos de la bicapa de lípidos pero unidas mediante enlace covalente a un lípido que forma parte de la bicapa. En condiciones típicas, los segmentos transmembrana de una proteína integral se presentan como hélices alfa, que pueden ser predominantemente hidrófobas cuando simplemente atraviesan la bicapa o anfipáticas si revisten un canal acuoso interno (p. 118).

Las membranas son estructuras muy asimétricas cuyas dos hojas tienen propiedades diferentes. Por ejemplo, todas las cadenas de carbohidrato de la membrana se apartan del citoplasma; muchas proteínas integrales poseen sitios sobre su superficie extracelular que interactúan con ligandos extracelulares, y sitios sobre su superficie interna que interactúan con proteínas periféricas que forman parte del esqueleto interno de la membrana; el contenido de fosfolípidos de las dos mitades de la bicapa es altamente asimétrico. La organización de las proteínas dentro de la membrana se observa mejor en réplicas de fracturas por congelación en las cuales se congelan células, sus membranas se separan a través del centro de la bicapa por un plano de fractura y la superficie interna expuesta se visualiza mediante la formación de una réplica metálica (p. 131).

El estado físico de una bicapa de lípidos tiene consecuencias importantes en la movilidad lateral de fosfolípidos y proteínas integrales. La viscosidad de la bicapa y la temperatura a la cual sufre la transición de fase depende del grado de insaturación y longitud de la cadena lipoacil de los fosfolípidos. Para muchas actividades celulares es importante mantener la fluidez de la membrana, incluyendo transducción de señales, división celular y formación de regiones especializadas en la membrana. La difusión lateral de proteínas dentro de la membrana se demostró originalmente mediante fusión de la célula y se puede cuantificar con técnicas que siguen el movimiento de proteínas marcadas con compuestos fluorescentes o marcadores electrónicamente densos. La medición del coeficiente de difusión de proteínas integrales sugiere que la mayor parte son sometidas a influencias restrictivas que inhiben su motilidad. Las proteínas pueden ser restringidas por su asociación a otras proteínas integrales o a proteínas periféricas localizadas en ambas superficies de la membrana. Debido a estos diferentes tipos de restricción las membranas pueden lograr un grado considerable de estabilidad de organización, gracias a la cual se pueden diferenciar entre sí regiones particulares de la membrana (p. 131).

La membrana plasmática del eritrocito contiene dos proteínas integrales principales, banda 3 y glucoporina, y un esqueleto interno bien definido compuesto de proteínas periféricas. Cada subunidad de la banda 3 atraviesa la membrana cuando menos una docena de veces y contiene un canal interno a través del cual se intercambian aniones bicarbonato y cloro. La glucoporfirina es una proteína altamente glucosilada de función desconocida que contiene un solo dominio transmembrana consistente en una hélice α hidrófoba. El principal componente del esqueleto de la membrana es la proteína fibrosa espectrina que interactúa con otras proteínas periféricas, como la anquirina, para suministrar apoyo a la membrana y restringir la difusión de sus proteínas integrales (p. 139).

La membrana plasmática es una barrera selectivamente permeable que permite el paso de solutos por diferentes mecanismos, incluyendo difusión simple a través de la bicapa de lípidos o de los canales de la membrana, difusión facilitada y transporte activo. La difusión es un proceso independiente de energía en el cual un soluto se mueve a favor de un gradiente electroquímico, disipando la energía libre almacenada en el gradiente. Pequeños solutos inorgánicos, como O_2 , CO_2 y H_2O penetran con facilidad en la bicapa de lípidos, igual que los solutos con coeficiente de partición elevado (liposolubilidad elevada). Iones y solutos orgánicos polares, como azúcares y aminoácidos, requieren transportadores especiales para entrar o salir de la célula (p. 141).

El agua se desplaza por ósmosis directamente a través de la bicapa de lípidos de una membrana semipermeable desde una región con baja concentración de soluto (compartimiento hipotónico) a otra con concentración elevada de soluto

(compartimiento hipertónico). La ósmosis desempeña un papel clave en gran número de actividades fisiológicas. Por ejemplo, en plantas, el ingreso de agua genera presión por turgencia contra la pared celular que ayuda a apoyar los tejidos no leñosos. Los iones difunden a través de una membrana plasmática por medio de canales especiales revestidos de proteína que con frecuencia son específicos para iones particulares. Los canales iónicos de ordinario son abiertos y controlados por voltaje o ligandos químicos, como los neurotransmisores (p. 143).

Difusión facilitada y transporte activo implican proteínas integrales de membrana que se combinan específicamente con el soluto que transportan. Los facilitadores del transporte actúan sin aporte de energía y tienen capacidad para desplazar solutos en ambas direcciones a través de la membrana, siguiendo su gradiente de concentración. Se cree que actúan cambiando su conformación, la cual expone el sitio de unión al soluto alternativamente en ambos lados de la membrana. El transportador de glucosa es un facilitador del transporte cuya presencia en la membrana plasmática se estimula incrementando la concentración de insulina. Los transportadores activos requieren aporte de energía y mueven iones y solutos contra un gradiente de concentración. Los transportadores activos tipo P, como la ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$, son operados por la transferencia de un grupo fosfato del ATP al transportador, lo que cambia su afinidad hacia el ion transportado. Los sistemas secundarios de transporte activo aprovechan la energía almacenada en un gradiente iónico para transportar un segundo soluto contra un gradiente. Por ejemplo, el transporte activo de glucosa a través de la superficie apical de una célula epitelial del intestino es operado por el cotransporte de Na^+ a favor de su gradiente electroquímico (p. 147).

El potencial de reposo a través de la membrana plasmática se debe principalmente a la limitada permeabilidad de la membrana al K^+ y está sujeto a cambios espectaculares. El potencial de reposo de una célula típica, nerviosa o muscular, es de casi -70 mV (interior negativo). Cuando se despolariza la membrana de una célula excitable más allá de un valor umbral, se inician acontecimientos que abren las compuertas de los canales de Na^+ y permiten el ingreso de Na^+ al interior, lo que provoca inversión del voltaje a través de la membrana. Después de que se abren las compuertas del Na^+ se cierran en cuestión de milisegundos y entonces se abren los canales de potasio, lo que provoca la salida de K^+ al exterior y el restablecimiento del potencial de reposo. La serie de cambios espectaculares en el potencial de membrana luego de la despolarización constituye un potencial de acción (p. 151).

Una vez iniciado un potencial de acción, se convierte en un proceso de autopropagación. La propagación se debe a la despolarización que acompaña al potencial de acción generado en un sitio de la membrana suficiente para despolarizar la membrana adyacente, donde a su vez se inicia un potencial de acción. En un axón mielinizado, el potencial de acción producido en un nódulo de la vaina es capaz de despolarizar la membrana en el siguiente nódulo, lo que permite que el potencial de acción salte rápidamente de un nódulo a otro. Cuando el potencial de acción alcanza los botones terminales de un axón se abren las compuertas de calcio en la membrana plasmática y permiten el flujo hacia adentro de Ca^{2+} , el cual desencadena la fusión de membranas de las vesículas secretorias que contienen el neurotransmisor con la membrana plasmática situada por arriba. El neurotransmisor difunde a través de la hendidura sináptica, donde se enlaza a receptores en la membrana postsináptica induciendo la despolarización o la hiperpolarización de células específicas (p. 156).

PREGUNTAS DE REPASO

1. Elaborar una lista de algunas funciones importantes de las membranas para la vida de las células eucariotas.
2. Describir la estructura y propiedades de una bicapa artificial de lípidos.
3. ¿Por qué se requieren detergentes para solubilizar las proteínas de la membrana? ¿Cómo se puede determinar la diversidad de las proteínas integrales que residen en una fracción purificada de membrana?
4. ¿Cuál es la importancia de la insaturación de los ácidos grasos sobre la fluidez de la membrana? ¿De las enzimas capaces de insaturar ácidos grasos?
5. Describir la asimetría de la membrana plasmática en términos de cada uno de sus principales elementos: proteínas, lípidos y carbohidratos.
6. Describir las propiedades de los tres tipos de proteínas de membrana (integral, periférica y anclada a lípidos) en que difieren una de la otra y cómo varían entre sí.
7. ¿Qué significa *réplica* por fractura de congelación? ¿En qué difiere la réplica de una fractura por congelación y una réplica lograda mediante la técnica de congelación al agua-fuerte respecto de la información que suministran de la membrana plasmática?
8. Comparar la velocidad de difusión lateral de un lípido con la de flip-flop. ¿Cuál es la razón de esa diferencia?
9. ¿Por qué es importante la fluidez de la membrana para la célula?
10. ¿Cómo puede existir una carga iónica diferente en ambos lados de una bicapa de lípidos?
11. Describir las tres técnicas que pueden emplearse para medir la velocidad de difusión de una proteína de membrana específica.
12. Comparar y contrastar las cuatro diferentes maneras básicas de desplazamiento de una sustancia a través de una membrana plasmática (según se indica en la figura 4-32).
13. Comparar las diferencias energéticas entre la difusión de un electrólito en comparación con la de un no electrólito a través de la membrana.
14. Describir la relación entre coeficiente de partición y tamaño de partícula en relación con la permeabilidad de la membrana.

15. Explicar los efectos de colocar una célula en un medio hipotónico, uno hipertónico o uno isotónico.
16. Describir dos maneras de aprovechar la energía para desplazar iones y solutos contra un gradiente de concentración.
17. ¿De qué manera ilustra la ATPasa de Na^+ - K^+ la lateralidad de la membrana plasmática?
18. ¿Cuál es el papel de la fosforilación en el mecanismo de acción de la ATPasa de Na^+ - K^+ ?
19. ¿Cuál es el papel de la vaina de mielina en la conducción de un impulso?
20. Describir los pasos entre el momento en que un impulso alcanza el botón terminal de una neurona presináptica y la generación de un potencial de acción en una célula postsináptica.

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. ¿Qué tipo de proteínas integrales podría esperarse que residan en la membrana plasmática de una célula epitelial que estuvieran ausentes en la de un eritrocito? ¿Cómo se relacionan estas diferencias con las actividades de estas células?
2. Muchos tipos diferentes de células poseen receptores que se unen a hormonas esteroides. ¿En qué sitio de la célula piensa usted que podrían residir esos receptores? ¿En qué sitio de la célula podría esperarse que resida el receptor de insulina? ¿Por qué?
3. Cuando se publicó por primera vez el aspecto trilaminar de la membrana plasmática, las imágenes se tomaron como evidencia que apoya el modelo de Davson-Danielli de la estructura de la membrana plasmática. ¿Por qué piensa usted que esas micrografías se interpretaron de esa manera? ¿Qué evidencia se podría emplear para argüir contra esa interpretación?
4. Supongamos que usted planea utilizar liposomas para tratar de administrar fármacos a un tipo particular de célula del cuerpo, por ejemplo, células adiposas o musculares. ¿Hay alguna forma de construir el liposoma para incrementar su especificidad?
5. ¿Cómo es que polisacáridos diferentes, como almidón y glucógeno, y los oligosacáridos sobre las superficies de la membrana plasmática pueden participar en interacciones específicas? ¿Cómo se ilustra esta característica al determinar el tipo sanguíneo de una persona antes de administrarle una transfusión?
6. La tripsina es una enzima que puede digerir las porciones hidrófilas de las proteínas de membrana, pero no puede atravesar la bicapa de lípidos y entrar a las células. Debido a estas propiedades, se emplea la tripsina junto con EGPA-DSS para determinar cuáles proteínas tiene un dominio extracelular. Describir un experimento utilizando tripsina para determinar la lateralidad de las proteínas de la membrana del eritrocito.
7. ¿Describiría usted el segmento transmembrana S4 del canal iónico K^+ como una hélice hidrófoba, una hélice anfipática o de algún otro tipo? ¿Por qué?
8. Supongamos que usted cultiva una población de bacterias a 15°C y luego eleva la temperatura del cultivo a 37°C . ¿Qué efecto podría tener sobre la composición de los ácidos grasos de la membrana? ¿Sobre la temperatura de transición de la bicapa de lípidos? ¿Sobre la actividad de las desaturasas de la membrana?
9. Obsérvese la figura 4-6. ¿Qué lípidos sería de esperar que tuvieran la mayor velocidad de flip-flop? ¿Cuáles tendrían la menor? ¿Por qué? Si experimentalmente se determinara que la fosfatidilcolina muestra realmente la mayor velocidad flip-flop, ¿cómo explicaría usted este dato? ¿Cuál sería la expectativa si se compara la velocidad flip-flop de fosfolípidos contra una proteína integral? ¿por qué?
10. Si usted leyera que la administración de uabaína bloquea la captación de glucosa en el intestino de un animal de laboratorio, ¿concluiría que la uabaína debe ser un inhibidor del simporte de Na^+ -glucosa? ¿Por qué sí o por qué no?
11. Si se inyecta al axón gigante del calamar un pequeño volumen de solución que contenga 0.1 M NaCl y 0.1 M KCl, en la cual ambos iones Na^+ y K^+ están marcados con isótopos radiactivos, ¿cuál de los iones marcados cree usted que aparecería con mayor rapidez en el medio (agua de mar) en tanto la neurona permanece en reposo? ¿Después de estimular la neurona para generar algunos potenciales de acción?
12. Cuando se trata a eritrocitos con neuraminidasa, una enzima que elimina el ácido siálico de las glucoproteínas, y luego se inyectan al animal del cual se extrajeron, los estudios indican que el bazo elimina los eritrocitos de la corriente sanguínea. ¿Puede usted elaborar una hipótesis para explicar lo que ocurre?
13. ¿Por qué los coeficientes de difusión medidos para lípidos dentro de la membrana tienden a estar más próximos a los valores esperados para difusión libre que los medidos para proteínas integrales en las mismas membranas?
14. Asumiendo que la membrana plasmática de una célula de pronto fuera permeable en igual magnitud tanto a iones Na^+ como K^+ y que cada ion respondiera a su gradiente de concentración en igual magnitud, ¿podría esperarse que estos dos iones se movieran a través de la membrana a la misma velocidad? ¿Por qué sí o por qué no?
15. La mayor parte de los invertebrados marinos no pierden ni ganan agua por ósmosis, en tanto que casi todos los vertebrados marinos sufren pérdida continua de agua en un ambiente salino concentrado. Suponer las bases de esta diferencia y por qué puede reflejar diferentes vías de evolución de los dos grupos.
16. ¿Cómo se compara la concentración de solutos dentro de una célula vegetal con la de los líquidos extracelulares? ¿Sería de esperar que lo mismo fuera cierto para las células de un animal?
17. ¿Cuáles serían las consecuencias de conducir un impulso si los canales de Na^+ fueran capaces de reabrirse de inmediato luego de cerrarse durante el potencial de acción?

BIBLIOGRAFIA

Estructura y función de la membrana

- Agre, P.C. y Cartron, J.P., eds. 1992. *Protein Blood Group Antigens of the Human Red Cell*. Johns Hopkins Univ. Press.
- Agre, P. 1989. *Red Blood Cell Membranes*. Dekker.
- Bennett, V. y Gilligan, D.M. 1993. The spectrin-based membrane skeleton and micron scale organization of the plasma membrane. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9:27-66.
- Bloch, R.J. y Pumpin, D.W. 1992. A model of spectrin as a concertina in the erythrocyte membrane skeleton. *Trends Cell Biol.* 2:186-189.
- Cherry, R.J. 1992. Keeping track of cell surface receptors. *Trends Cell Biol.* 2:242-244.
- Cowan, S.W. y Rosenbusch, J.P. 1994. Folding pattern diversity of integral membrane proteins. *Science* 254:914-916.
- Cross, G.A.M. 1990. Glycolipid anchoring of plasma membrane proteins. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6:1-39.
- Devaux, P.F. 1991. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochem.* 30:1163-1173.
- Edidin, M. 1992. Patches, posts, and fences: Proteins and plasma membrane domains. *Trends Cell Biol.* 2:376-380.
- Englund, P.T. 1993. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Ann. Rev. Biochem.* 62:121-138.
- Gennis, R.B. 1989. *Biomembranes: Molecular Structure and Function*. Springer-Verlag.
- Gratzer, W. 1994. Silence speaks in spectrin. *Nature* 372:620-621.
- Hakomori, S. 1986. Glycosphingolipids. *Sci. Am.* 254:44-54 (mayo).
- Harwood, J. 1991. Strategies for coping with low environmental temperatures. *Trends Biochem. Sci.* 16:126-127.
- Hazel, J.R. y Williams, E.E. 1990. The role of alteration in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog. Lipid Res.* 29:167-227.
- Jennings, M.L. 1989. Topography of membrane proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 57:999-1027.
- Kutay, U., Hartmann, E. y Rappaport, T.A. 1993. A class of membrane proteins with a C-terminal anchor. *Trends Cell Biol.* 3:72-75.
- Luna, E.J. y Hitt, A.L. 1992. Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science* 258:955-964.
- Maresca, B. y Cossins, A.R. 1993. Fatty feedback and fluidity. *Nature* 365:606-607.
- Nelson, W.J. 1992. Regulation of cell surface polarity from bacteria to mammals. *Science* 258:948-955.
- Palek, J. y Sahr, K.E. 1992. Mutations of the red blood cell membrane proteins: from clinical evaluation to detection of the underlying genetic defect. *Blood* 80:308-330.
- Petty, H.R. 1993. *Molecular Biology of Membranes*. Plenum.
- Pumpin, D.W. y Bloch, R.J. 1993. The membrane skeleton. *Trends Cell Biol.* 3:113-117.
- Quinn, P.J. y Cherry, R.J. 1992. *Structure and Dynamic Properties of Lipids and Membranes*. Ashgate.
- Rodriguez-Boulán, E. y Nelson, W.J. 1989. Morphogenesis of the polarized cell phenotype. *Science* 245:718-725.
- Singer, S.J. 1990. The structure and insertion of integral membrane proteins. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6:247-296.
- Singer, S.J. 1992. The structure and function of membranes—A personal memoir. *J. Memb. Biol.* 129:3-12.
- Unwin, N. y Henderson, R. 1984. The structure of proteins in biological membranes. *Sci. Am.* 250:78-94 (feb.).
- Verkman, A.S. 1992. Water channels in cell membranes. *Ann. Rev. Physiol.* 54:97-108.
- Yeagle, P.L. 1993. *The Membranes of Cells*. 2a. edición, Academic Press.
- Zhang, F., Lee, G.M. y Jacobson, K. 1993. Protein lateral mobility as a reflection of membrane microstructure. *Bioess.* 15:519-588.

Movimiento de solutos a través de membranas

- Aldrich, R. 1993. Advent of a new family. *Nature* 362:108.
- Ames, G.F. y cols. 1992. Traffic ATPases: A superfamily of transport proteins operating from *E. coli* to humans. *Adv. Enzym.* 65:1-47.
- Ashcroft, J.M. y Roper, J. 1993. Transporters, channels, and human disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:677-683.
- Burant, C.F. y cols. 1991. Mamalian glucose transporters: Structure and molecular regulation. *Rec. Prog. Horm. Res.* 47:349-388.
- Byrne, J.H. 1994. *An Introduction to Membrane Transport and Bioelectricity*. Raven.
- Carafoli, E. 1994. Biogenesis: Plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB J.* 8:993-1002.
- Catterall, W.A. 1992. Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels. *Physiol. Revs.* 72:S15-S48.
- Elsas, L.J. y Longo, N. 1992. Glucose transporters. *Ann. Rev. Med.* 43:377-393.
- Galzi, J.-L. y cols. 1993. Mutations in the channel domain of a neuronal nicotinic receptor converts ion selectivity from cationic to anionic. *Nature* 359:500-505.
- Gould, G.W. y Bell, G.I. 1990. Facilitative glucose transporters: An expanding family. *Trends Biochem. Sci.* 15:18-23.
- Harvey, W.R. y Nelson, N. eds. 1993. V-ATPases. *J. Exp. Biol.* vol. 172.
- Henderson, P.J.F. 1993. The 12-transmembrane helix transporters. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:708-721.
- Hess, P. 1990. Calcium channels in vertebrate cells. *Ann. Rev. Neurosci.* 13:337-356.
- Higgins, C.F. 1992. ABC transporters: From microorganisms to man. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8:67-113.
- Hille, B. 1991. *Ionic Channels of Excitable Membrane*. 2a. edición, Sinauer.
- Jan, L.Y. y Jan, Y.N. 1992. Tracing the roots of ion channels. *Cell* 69:715-718.
- Jan, L.Y. y Jan, Y.N. 1994. Potassium channels and their evolving gates. *Nature* 371:119-122.
- Jan, L.Y. y Jan, Y.N. eds. 1994. Membrane permeability. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:569-615.
- Koepsell, H. y Spangenberg, J. 1994. Function and presumed molecular structure of Na⁺-D-glucose cotransport system. *J. Memb. Biol.* 138:1-11.
- Levitan, I.B. 1994. Modulation of ion channels by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Ann. Rev. Physiol.* 56:193-212.
- Maathius, F.J.M. y Sanders, D. 1992. Plant membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:661-669.
- Miller, C. 1992. Ion channel structure and function. *Science* 258:240-241.
- Mills, J.W. y Mandel, L.M. 1994. Cytoskeletal regulation of membrane transport events. *FASEB J.* 8:1161-1165.
- Neher, E. 1992. Ion channels for communication between and within cells. *EMBO J.* 11:1173-1679.
- Palmer, L.G. 1992. Epithelial sodium channels: Function and diversity. *Ann. Rev. Physiol.* 54:51-66.

- Pessin, J.E. y Bell, G.I. 1992. Mammalian glucose transporter family: Structure and molecular regulation. *Ann. Rev. Physiol.* 54:911-930.
- Reeves, W.B. y Andreoli, T.E. 1992. Renal epithelial chloride channels. *Ann. Rev. Physiol.* 54:29-50.
- Salkoff, L. y cols. 1992. An essential "set" of K⁺ channels conserved in flies, mice and humans. *Trends. Neurosci.* 15:161-166.
- Schafer, J.H. y cols. 1992. *Membrane Transport in Biology*, vol. 6, Springer-Verlag.
- Skou, J.C. 1989. Identification of the sodium pump as the membrane-bound Na⁺/K⁺-ATPase. *Bioc. Biop. Acta* 1000:435-446.
- Stein, W.D. 1990. *Channels, Carriers, and Pumps: An Introduction to Membrane Transport*. Academic Press.
- Unwin, N. 1995. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature* 373:37-43.

Fibrosis quística

- Anderson, M.P. y cols. 1991. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its ion selectivity. *Science* 253:202-205.
- Collins, F.S. y Wilson, J.M. 1992. A welcome animal model. *Nature* 358:708-709.
- Knowles, M.R. y cols. 1995. A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfer in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *New Engl. J. Med.* 333:823-831.
- Miller, C. 1993. Sickly channels in mild disease. *Nature* 362:106.

- Riordan, J.R. 1993. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Ann. Rev. Physiol.* 55:609-630.
- Welsh, M.J. y Smith, A.E. 1993. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73:1251-1254.
- Wilson, J.M. 1993. Cystic fibrosis: Vehicles for gene therapy. *Nature* 365:691-692.

Transmisión sináptica de impulsos nerviosos

- Caron, M.G. 1993. The chimeras speak again. *Nature* 366:409-410.
- Catterall, W.A. 1995. Structure and function of voltage-gated ion channels. *Ann. Rev. Bioch.* 64:493-531.
- Changeux, J.-P. 1993. Chemical signaling in the brain. *Sci. Am.* 269:58-62 (nov.).
- Franks, N.P. y Lieb, W.R. 1993. Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 367:607-614.
- Jackson, M.B. 1994. Single channel currents in the nicotinic acetylcholine receptor. *Trends Biochem. Sci.* 18:396-399.
- Jessel, T.M. y cols. 1993. Synaptic transmission: Nine reviews. *Cell* 72, suppl. 1-149.
- Hall, Z.W. 1992. *An Introduction to Molecular Neurobiology*. Sinauer.
- Karlin, A. 1991. Explorations of the nicotinic acetylcholine receptor. *Harvey Lects.* 85:71-107.
- Sakmann, B. 1992. Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels. *EMBO J.* 11:2003-2116.

Respiración aerobia y mitocondrias

5-1 Estructura y función de las mitocondrias

5-2 Metabolismo oxidativo en el citoplasma y las mitocondrias

5-3 Papel de las mitocondrias en la formación de ATP

La perspectiva humana: Papel del metabolismo anaerobio y aerobio en el ejercicio

5-4 Translocación de protones y establecimiento de una fuerza motriz de protones

5-5 Mecanismo para la formación de ATP

5-6 Importación de las proteínas mitocondriales

5-7 Peroxisomas

La vía experimental: Acoplamiento de oxidación a fosforilación

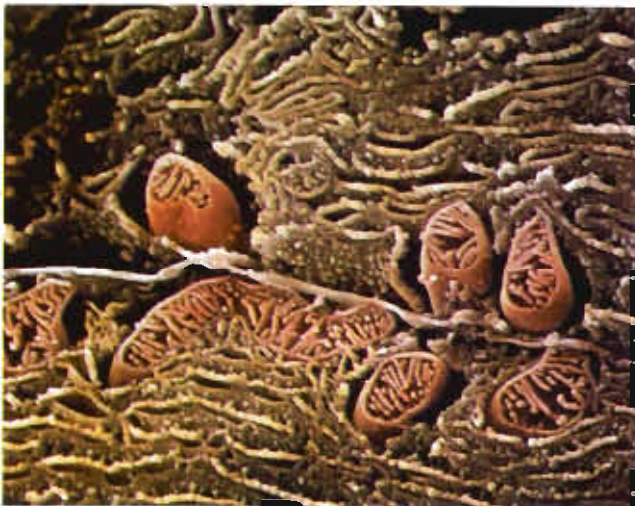


FIGURA 5-A. Gammagrama pseudocoloreado de un hepatocito fracturado que muestra las formas y la estructura interna de las mitocondrias. (Cortesía de Lennart Nilsson.)

En los primeros 2 000 millones de años de vida en el planeta, la atmósfera consistió principalmente en moléculas reducidas, como hidrógeno molecular (H_2), amoníaco (NH_3) y H_2O . En ese periodo la Tierra estuvo poblada por **anaerobios**, microorganismos que captan y utilizan la energía por medio de un metabolismo independiente de oxígeno (anaerobio), como la glucólisis y la fermentación. Luego aparecieron las cianobacterias, un nuevo tipo de microorganismos que efectúan una forma diferente de proceso fotosintético en el cual se separan moléculas de agua y se libera oxígeno molecular (O_2). Las cianobacterias tuvieron gran éxito, y los océanos, los lagos y la atmósfera rápidamente se llenaron del nuevo gas.

Según se analiza en la página 34, el oxígeno puede ser una sustancia muy tóxica que capta electrones extra y reacciona con gran variedad de moléculas biológicas. La primera vez que apareció el oxígeno debió haber provocado la muerte por oxidación a todos los microorganismos, menos a unos cuantos tipos. Sin embargo, con el tiempo evolucionaron especies que no sólo estaban protegidas de los efectos dañinos del oxígeno molecular, sino que poseían vías metabólicas que utilizan esas moléculas con gran provecho. En ausencia de oxígeno, los microorganismos sólo pueden extraer una limitada cantidad de energía de sus nutrientes, excretando productos como ácido láctico y etanol, incapaces de metabolismo adicional. Por lo contrario, los microorganismos que incorporan O_2 en su estrategia metabólica pueden oxidar por completo compuestos como CO_2 y H_2O , y en el proceso extraer un porcentaje mucho mayor del

contenido energético de dichos compuestos. Esos microorganismos que se convirtieron en dependientes de oxígeno fueron los primeros **aerobios** sobre la tierra y finalmente dieron lugar a todos los procariotes y eucariotes dependientes de oxígeno que viven en la actualidad. En los eucariotes, el aprovechamiento de oxígeno para extraer energía tiene lugar en organelos especializados, las mitocondrias.

5-1 Estructura y función de las mitocondrias

A diferencia de la mayor parte de los organelos citoplásmicos, las mitocondrias son lo bastante grandes para observarse con el microscopio de luz (fig. 5-1, *a*) y su presencia dentro de la célula se conoce desde hace algunos cientos de años. Aun antes de que empezara este siglo ya se habían aislado mitocondrias de tejidos disecando las células con una aguja fina, y se describieron algunas de las propiedades de estos organelos. Por ejemplo, se demostró que las mitocondrias eran osmóticamente activas; o sea, que se hinchan en un medio hipotónico y se encogen en un medio hipertónico. Esta propiedad sugiere que las mitocondrias están rodeadas por una membrana semipermeable parecida a la que rodea a la propia célula.

Igual que muchos otros organelos, la mitocondria posee características morfológicas reconocibles, pero muestra gran variabilidad en su apariencia. Las mitocondrias típicas tienen forma de salchicha (fig. 5-1, *b*), aproximadamente 0.2 a $1.0\ \mu\text{m}$ de diámetro en corte transversal y 1 a $4\ \mu\text{m}$ de longitud. El hecho de que las mitocondrias tengan un tamaño similar al de las bacterias es algo más que una simple coincidencia, puesto que numerosas pruebas sugieren que estos organelos evolucionaron a partir de bacterias que vi-

vían en **simbiosis** dentro de otras células. En algunas células, como las del embrión inicial, las mitocondrias tienen forma casi esférica, en tanto que en otros, como los fibroblastos, son estructuras alargadas fibrinosas (fig. 5-1, *a*).

En concordancia con su función principal de **poner la energía a disponibilidad de la célula**, el tamaño y número de las mitocondrias y su localización dentro de la célula varían de un tipo de célula a otro. Un hepatocito promedio de mamífero contiene casi 1 500 mitocondrias, que corresponde a 15 o 20% del volumen celular. Las mitocondrias son todavía más abundantes en las células musculares, que requieren gran cantidad de ATP como combustible para la contracción. Las mitocondrias a menudo se relacionan con gotas oleosas que contienen ácidos grasos y de las cuales obtienen la materia prima que deben oxidar. En las células del espermatozoide se observa una disposición particularmente notable de las mitocondrias, donde se localizan en la "porción media" de la célula, justo por detrás del núcleo (fig. 5-1, *c*). Los movimientos del espermatozoide pueden efectuarse gracias a la energía suministrada por el ATP de estas mitocondrias. Las mitocondrias también son prominentes en muchas células vegetales, donde proporcionan el suministro primario de ATP a tejidos que no efectúan fotosíntesis, y también son fuente de ATP para las células de hojas fotosintéticas durante periodos de oscuridad.

En la micrografía de la figura 5-2, *a*, se muestra la estructura interna de una mitocondria, y en la figura 5-2, *b*, se presenta esquemáticamente. El papel de la mitocondria como **transductor de energía** está íntimamente ligado a las membranas tan prominentes de las micrografías electrónicas de estos organelos. Cada mitocondria contiene una **membrana externa** y un complejo sistema de **membranas internas**. La membrana externa envuelve por completo a la mitocondria y sirve como frontera exterior. Una parte de

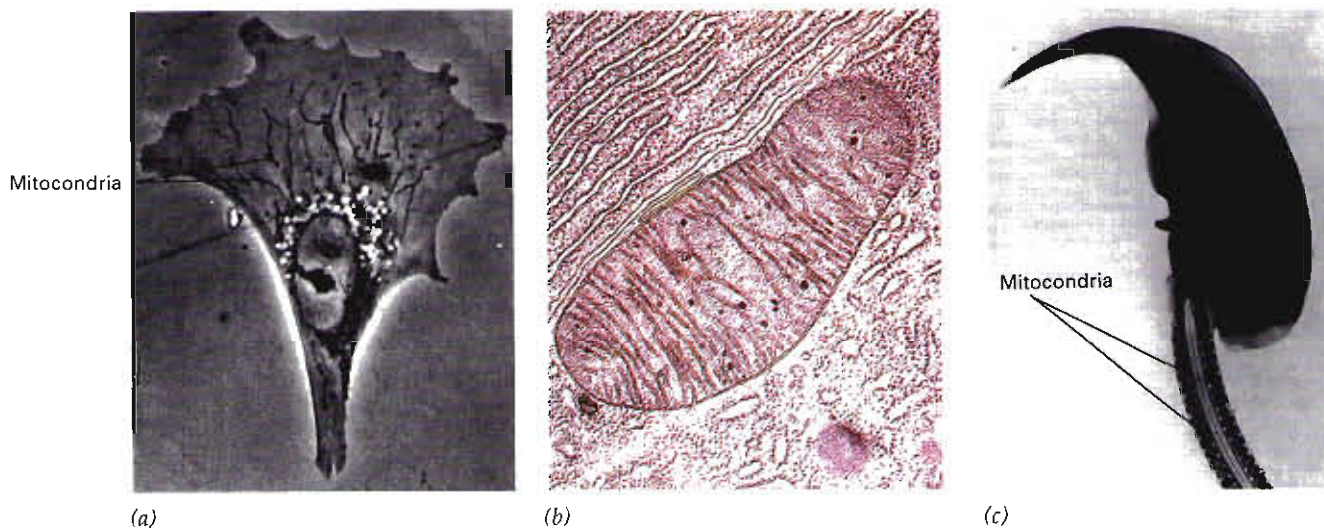


FIGURA 5-1. Mitocondria. *a*) Fibroblasto viviente observado con microscopio de contraste de fases. Las mitocondrias se ven como corpúsculos oscuros alargados. *b*) Micrografía electrónica de transmisión de una delgada sección a través de una mitocondria que revela la estructura interna del organelo, particularmente los pliegues membranosos (crestas) de la membrana interna. *c*) Localización de las mitocondrias en la pieza media del espermatozoide que rodea la porción proximal del flagelo. (*a*: Cortesía de Norman K. Wessels; *b*: K.R. Porter/Photo Researchers; *c*: cortesía de Don W. Fawcett.)

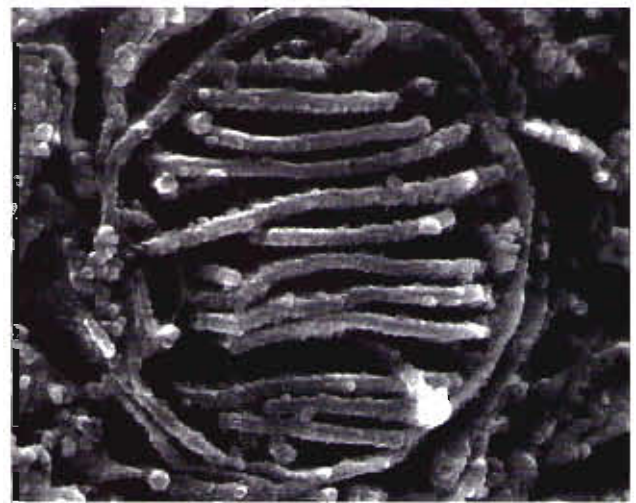
la membrana interna se sitúa justo por dentro de la membrana externa, pero gran parte de ella forma pliegues profundos o invaginaciones llamadas **crestas** (figs. 5-1, b, y 5-2). En algunas células, como el hepatocito de mamífero, las crestas son hojas anchas que ocupan todo el diámetro transversal de la mitocondria. En la mayor parte de las células vegetales, las crestas tienen forma más tubular. En los pliegues de la membrana interna aumenta mucho la superficie disponible para alojar el mecanismo necesario para la respiración aerobia.

Las membranas de la mitocondria dividen el organelo en dos compartimientos acuosos, uno entre el centro de la mitocondria denominado **matriz** y otro compartimiento entre las membranas externa e interna, denominado **espacio intermembrana**. La matriz tiene consistencia parecida a un gel por la presencia de una elevada concentración de proteínas hidrosolubles (hasta 500 mg/ml). En las micrografías y diagramas de las figuras 5-1 y 5-2 el espacio intermembrana aparece más bien limitado, pero durante la respiración activa este compartimiento puede ser muy extenso.

Membranas mitocondriales

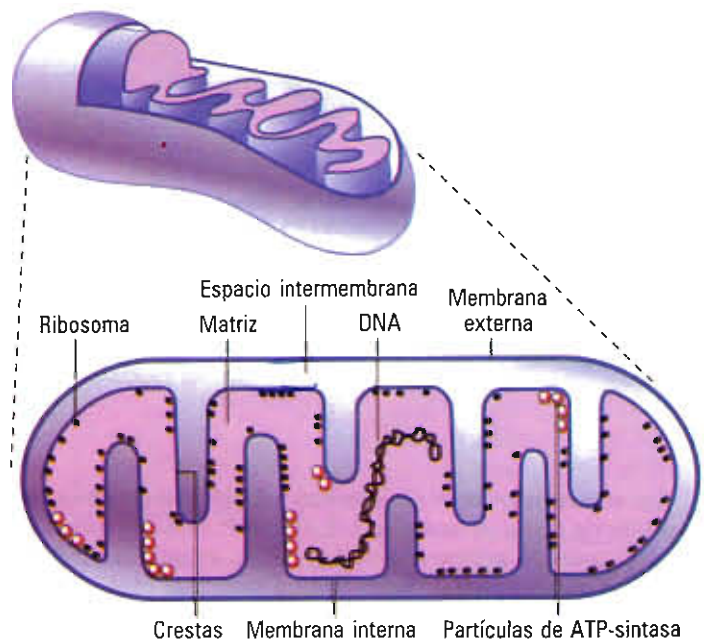
Las membranas externa e interna tienen propiedades muy diferentes. La membrana externa contiene casi 50% de lípidos en peso y una curiosa mezcla de enzimas que participan en actividades tan diversas como oxidación de adrenalina, descomposición de triptófano y alargamiento de ácidos grasos. Por lo contrario, la membrana interna tiene una relación proteína/lípido sumamente alta (más de 3:1 en peso, que corresponde a una molécula de proteína por cada 15 fosfolípidos, aproximadamente). Dentro de la compleja estructura de esta membrana se encuentran cuando menos 60 polipéptidos diferentes. La membrana interna casi está desprovista de colesterol y es rica en un fosfolípido poco común, la cardiolipina (difosfatidilglicerol, cuya estructura se muestra en la figura 4-6); ambas características corresponden a la membrana plasmática de las bacterias, de la cual se presume que durante la evolución se derivó la membrana mitocondrial interna. Se cree que la membrana mitocondrial externa proviene de una membrana externa observada como parte de la pared celular de ciertas células bacterianas (fig. 5-3); ambas contienen porinas, proteínas integrales que forman grandes canales no selectivos en la membrana. Gracias a las porinas, la membrana externa es especialmente permeable y permite que moléculas mayores de 10 000 daltons pasen libremente hacia el espacio intermembrana. Por lo tanto, para la mayor parte de los solutos el espacio intermembrana se continúa con el citoplasma. Por lo contrario, la membrana interna es bastante impermeable; casi todas las moléculas y iones requieren transportadores especiales situados en dicha membrana interna para tener acceso a la matriz.

Como analizaremos en la siguientes secciones, la composición y la organización de la membrana interna son la clave de las actividades bioenergéticas del organelo. Además, por contener una gran variedad de sistemas de transporte, en la membrana mitocondrial interna reside la mayor parte del mecanismo necesario para la síntesis de ATP.



(a)

0.2 μm



(b)

FIGURA 5-2. Estructura de una mitocondria. a) Gammagrama de una mitocondria congelada, fracturada y tratada al "aguafuerte" para resaltar los relieves que muestran la matriz interna encerrada por los pliegues de la membrana interna. b) Esquema que muestra la estructura interna de una mitocondria. (a: Según K. Tanaka, *Int. Rev. Cytol.* 68:111, 1980.)

La arquitectura de la membrana interna y la aparente fluidez de su bicapa facilitan la interacción de los componentes requeridos para la formación de ATP.

La matriz mitocondrial

Además de las diferentes enzimas, la matriz mitocondrial también contiene ribosomas (de tamaño mucho menor que

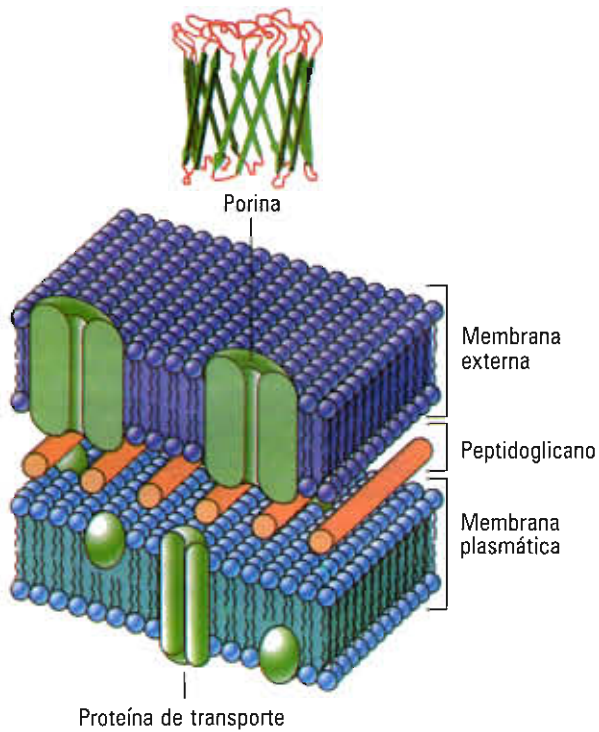


FIGURA 5-3. Porinas. Las bacterias gramnegativas poseen una membrana externa que contiene lípidos por fuera de la membrana plasmática como parte de su pared celular. Esta membrana externa contiene proteínas, denominadas porinas, que constan de una hoja β como barril y forman una abertura a través de la cual puedan penetrar moléculas de tamaño moderado. Las porinas también se observan en la membrana mitocondrial externa de células eucariotas.

los encontrados en el citoplasma) y moléculas de DNA circular de doble cadena (fig. 5-2, b). Por lo tanto, la mitocondria posee su propio material genético, aunque limitado, y el mecanismo para elaborar RNA y proteínas propias. Este DNA no cromosómico es importante porque codifica un pequeño número de polipéptidos mitocondriales (13 en el hombre) integrados a la membrana mitocondrial interna junto con polipéptidos codificados por genes residentes en el núcleo e importados desde el sitio donde se sintetizan en el citoplasma (véase sección 5-7).

La observación de células vivientes desarrolladas en cultivo ha demostrado que las mitocondrias son organelos dinámicos que cambian su forma, se desplazan de un sitio a otro dentro del citoplasma y sufren ramificaciones. Además, se puede observar que las mitocondrias se fusionan entre sí y también pueden sufrir fisión. Igual que las membranas se originan de membranas previas y las células de células anteriores, las mitocondrias se originan por fisión de mitocondrias ya existentes (fig. 5-4). Además de un sistema genético, la matriz mitocondrial con frecuencia contiene filamentos y gránulos densos. Un tipo de gránulos contiene una reserva de iones calcio en forma de fosfato de calcio precipitado. Las mitocondrias son acumuladores activos de ion calcio, aunque su papel para regular la concentración

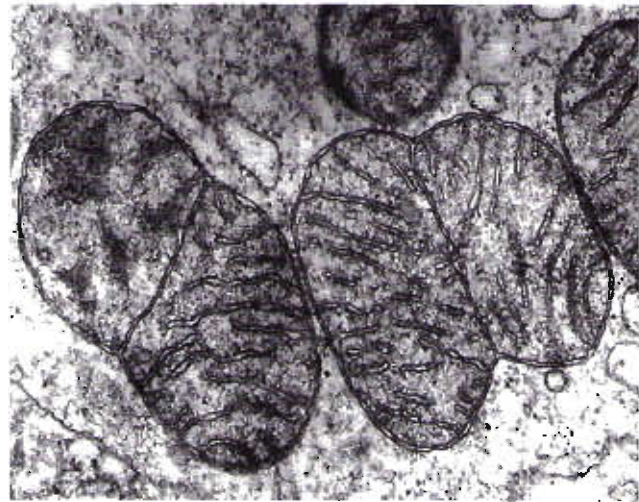
0.4 μ m

FIGURA 5-4. Fisión mitocondrial. Micrografía electrónica de las mitocondrias de las células de un insecto fijadas durante el proceso de desdoblamiento. (Según W.J. Larsen, J. Cell Biol. 47:379, 1970, con permiso de Rockefeller University Press.)

citoplásmica de este importante ion aún está sujeta a controversia.

En breve retornaremos el análisis de la estructura y función de las mitocondrias, pero primero es útil considerar el papel de estos organelos en las vías oxidativas básicas de las células eucariotas (resumido en la figura 5-5).

5-2 Metabolismo oxidativo en el citoplasma y las mitocondrias

En el capítulo 3 se describieron las etapas iniciales de la oxidación de carbohidratos. Las enzimas de la glucólisis efectúan los primeros pasos del proceso de oxidación de la glucosa; estas enzimas se localizan en el citoplasma (fig. 5-5). En la figura 3-23 se ilustraron las 10 reacciones que componen la vía glucolítica, y en la figura 5-6 se resumen los principales pasos de la vía. La glucólisis se inicia con la activación de una molécula de glucosa por fosforilación de dos átomos de carbono del azúcar a expensas de dos moléculas de ATP. El producto, fructosa 1,6-difosfato, es un difosfato de seis carbonos, que a continuación se desdobla en dos monofosfatos de tres carbonos. En reacciones subsecuentes, el aldehído de tres carbonos se oxida a un ácido de tres carbonos y genera una molécula de NADH, y los dos grupos fosfato se transfieren sucesivamente al ADP, generando dos moléculas de ATP por fosforilación a nivel sustrato. La eliminación del segundo fosfato genera piruvato, uno de los productos de la glucólisis.

Durante la glucólisis, la célula sólo puede aprovechar una pequeña fracción de la energía libre disponible en la glucosa, suficiente para sintetizar dos moléculas de ATP por cada molécula oxidada de glucosa (fig. 5-6). La mayor

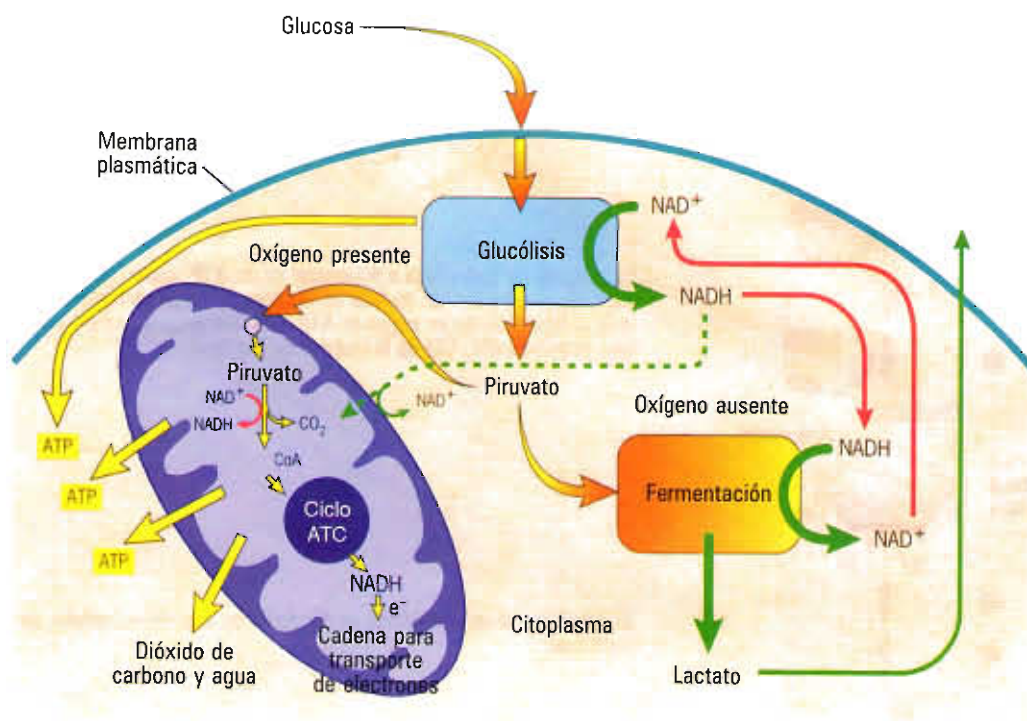


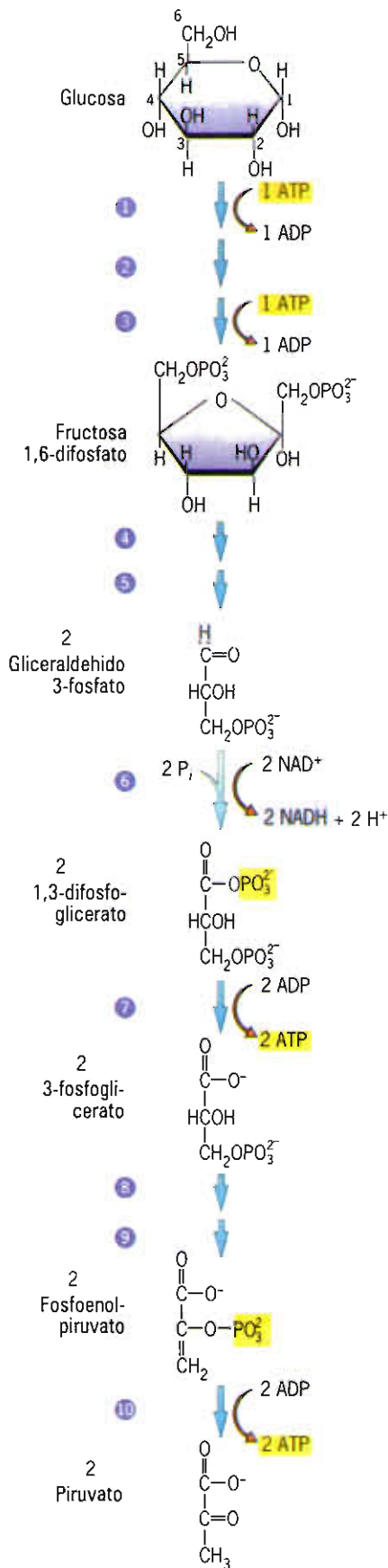
FIGURA 5-5. Diagrama del metabolismo de carbohidratos en células eucariotas. Las reacciones de glucólisis generan piruvato y NADH en el citoplasma. En ausencia de O₂, el piruvato se reduce a lactato (u otro producto de fermentación, como etanol en las levaduras), que se excreta, en tanto que el NAD⁺ se vuelve a utilizar para continuar la glucólisis. En presencia de O₂, el piruvato se desplaza al interior de la matriz (facilitado por un transportador de membrana), en donde se descarboxila y se une a la coenzima A (CoA), una reacción que genera NADH. El NADH producido durante la glucólisis dona sus electrones de alta energía a un compuesto que atraviesa la membrana mitocondrial interna, llevando los electrones a FAD (o NAD⁺) para formar FADH₂ (o NADH). La acetil-CoA ingresa al ciclo del ácido tricarboxílico (como se muestra en la figura 5-8), que genera GTP, NADH y FADH₂. Los electrones de estas moléculas de NADH y FADH₂ viajan a lo largo de la cadena transportadora de electrones, constituida por portadores integrados en la membrana mitocondrial interna, hasta el O₂ molecular. La energía liberada durante el transporte de electrones se emplea para la síntesis de ATP mediante un proceso analizado en detalle posteriormente en este capítulo. Si toda la energía del transporte de electrones fuera utilizada para la síntesis de ATP se podrían generar aproximadamente 36 ATP (incluyendo GTP) a partir de una sola molécula de glucosa.

parte de la energía permanece almacenada en el piruvato. Cada molécula de NADH sintetizada durante la oxidación de gliceraldehído 3-fosfato también transporta un par de "electrones de alta energía". Los dos productos de la glucólisis, piruvato y NADH, se pueden metabolizar siguiendo dos vías muy diferentes, según el tipo de célula en la cual se generan y la presencia o ausencia de oxígeno. Aunque el tema principal de este capítulo es la respiración aerobia (o sea, dependiente de oxígeno) y el papel de la mitocondria, es importante considerar de manera breve una vía alterna mediante la cual las células pueden continuar produciendo ATP en ausencia de oxígeno.

Oxidación anaerobia del piruvato: proceso de fermentación

Es evidente que la glucólisis puede suministrar a la célula una pequeña cantidad neta de ATP por cada molécula de glucosa oxidada. Sin embargo, como se analiza en *La perspectiva humana*, en la página 182, las reacciones glucolíticas ocurren a gran velocidad, de modo que por esta vía una

célula puede producir una cantidad significativa de ATP. En realidad, algunas células, incluyendo células de levadura, células tumorales y células musculares, dependen mucho de la glucólisis para la síntesis de ATP. Sin embargo, estas células deben confrontar un problema. Uno de los productos de la oxidación del gliceraldehído 3-fosfato es NADH. La formación de NADH ocurre a expensas de uno de los reactantes, NAD⁺, cuyo suministro es escaso para la célula. Puesto que en este importante paso de la glucólisis se requiere NAD⁺ como reactante, éste debe regenerarse a partir de NADH. Cuando esto no ocurre, la reacción no tiene lugar ni pueden proseguir las reacciones de la glucólisis que dependen de ese producto. Sin embargo, en ausencia de oxígeno no puede oxidarse NADH a NAD⁺ por medio de la cadena transportadora de electrones, puesto que el oxígeno es el aceptor final de electrones en la cadena. Las células también pueden regenerar NAD⁺ por **fermentación** transfiriendo electrones del NADH al piruvato, producto final de la glucólisis, o a un compuesto derivado de piruvato (fig. 5-7). Igual que la glucólisis, la fermentación tiene lugar en el citoplasma de la célula eucariota (fig. 5-5). En la mayor parte de los microorganismos que dependen de O₂,



La glucosa es fosforilada a expensas de un ATP, sufre redistribución estructural para formar fosfato de fructosa, y luego es fosforilada una vez más a expensas de un segundo ATP. Los dos grupos fosfato se sitúan en los dos extremos (C1, C6) de la cadena de fructosa.

El difosfato de seis carbonos se desdobra en dos monofosfatos de tres carbonos.

El aldehído de tres carbonos se oxida para formar un ácido conforme se emplean los electrones eliminados del sustrato para reducir la coenzima NAD^+ a NADH . Además, el ácido C1 se fosforila para formar un acilfosfato, el cual posee un potencial elevado para transferir grupos fosfato (denotado por el sombreado amarillo).

El grupo fosfato de C1 se transfiere a ADP para formar ATP por fosforilación a nivel de sustrato. Por cada glucosa oxidada se forman dos ATP.

Estas reacciones dan como resultado la redistribución y deshidratación del sustrato para formar un enolfosfato en la posición C2, que tiene un elevado potencial de transferencia de grupos fosfato.

El grupo fosfato se transfiere al ADP formando ATP por fosforilación a nivel de sustrato, generando una cetona en la posición C2. Por cada glucosa oxidada se forman dos ATP.

REACCIÓN NETA:



FIGURA 5-6. Esquema de la glucólisis que muestra alguno de los pasos clave. Incluye las dos reacciones de transferencia de grupos fosfato del ATP al azúcar de seis carbonos para formar fructosa 1,6-difosfato (pasos 1 y 3); la oxidación y la fosforilación de gliceraldehído 3-fosfato para formar 1,3-difosfoglicerato y NADH (paso 6), y la transferencia de grupos fosfato desde los sustratos fosforilados de tres carbonos al ADP para formar ATP por fosforilación de sustratos (pasos 7 y 10).

la fermentación es un subterfugio para regenerar NAD^+ cuando la concentración de O_2 es baja, de modo que la glucólisis pueda continuar y mantener la producción de ATP.

El producto de la fermentación varía de un tipo de célula o microorganismo a otro. Cuando se requiere contracción repetida de las células musculares, el suministro de oxígeno no tiene capacidad para mantener el paso con las demandas metabólicas de la célula. En esas condiciones, ciertos tipos de células musculares esqueléticas regeneran NAD^+ convirtiendo piruvato a lactato (véase *La perspectiva humana* en este capítulo). Al disponer otra vez de oxígeno en cantidad suficiente, el lactato puede convertirse de nuevo a piruvato para continuar la oxidación. Las células de las levaduras han enfrentado el desafío de la vida anaerobia con una solución metabólica diferente: convierten el piruvato a etanol, según se ilustra en la figura 5-7.

En muchos microorganismos la fermentación es un proceso coadyuvante necesario para el metabolismo, y en algunos anaerobios es la única fuente de energía metabólica, aunque la energía obtenida sólo por glucólisis es escasa en comparación con la oxidación completa de la glucosa hasta dióxido de carbono y agua. De las 686 kilocalorías que pueden liberarse en la oxidación completa de 1 mol de glucosa, sólo se liberan 57 cuando se convierte a etanol y nada más 47 cuando se convierte a lactato en condiciones estándar. En cualquier caso sólo se sintetizan dos moléculas de ATP por molécula de glucosa oxidada mediante glucólisis o fermentación; más de 90% de la energía simplemente se descarta en el producto de fermentación (según lo demuestra la inflamabilidad del alcohol etílico).

En las primeras etapas de la vida sobre la Tierra, cuando todavía no aparecía el oxígeno, la glucólisis y la fermentación tal vez fueron las vías metabólicas primarias de las células procariotas primitivas para extraer azúcares. Con la evolución de las cianobacterias, la atmósfera se llenó de oxígeno molecular permitiendo la evolución de una nueva estrategia metabólica, en la cual los productos de la glucólisis podían oxidarse por completo y producir mucho más ATP.

La vía aerobia para la oxidación de piruvato

Los aerobios emplean oxígeno molecular para extraer gran cantidad de energía a partir de los dos productos de la glucólisis, piruvato y NADH, suficiente para sintetizar más de 30 moléculas adicionales de ATP. Este proceso tiene lugar en las mitocondrias (fig. 5-5). Iniciaremos con el piruvato y más tarde volveremos a considerar el destino del NADH. Cada molécula de piruvato producida por glucólisis se transporta a través de la membrana mitocondrial interna hacia el interior de la matriz, donde es descarboxilada para formar

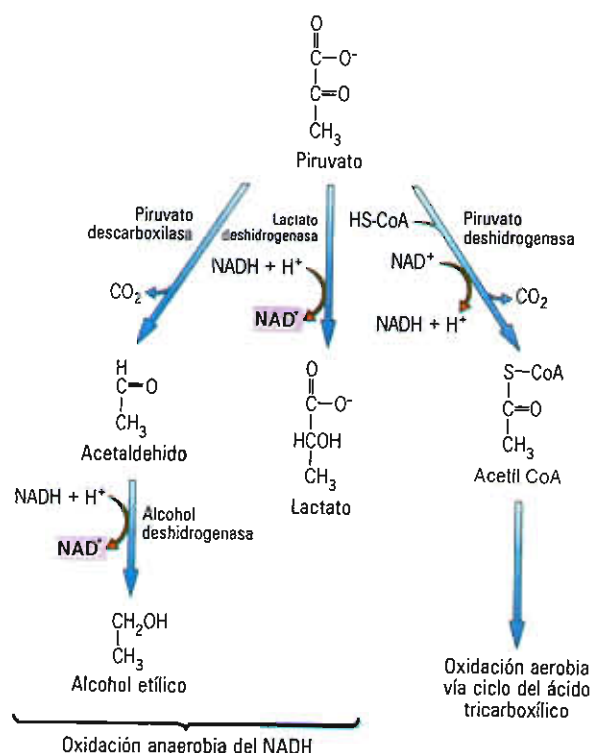
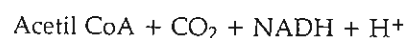
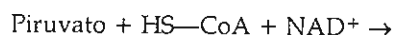


FIGURA 5-7. Fermentación. La mayor parte de las células efectúan respiración aerobia dependiente de oxígeno. Si el suministro de oxígeno disminuye, como ocurre en las células del músculo esquelético sometido a contracción extrema o en las células de las levaduras vivientes en condiciones anaerobias, estas células pueden regenerar NAD^+ por fermentación. Las células musculares efectúan la fermentación formando lactato, en tanto que las células de las levaduras lo hacen mediante la formación de etanol.

un grupo acetilo de dos carbonos ($-\text{CH}_3\text{COO}^-$). A continuación, el grupo acetilo forma un complejo con la coenzima A (un compuesto orgánico complejo derivado de la vitamina ácido pantoténico) para formar acetil-CoA.



La descarboxilación de piruvato y la transferencia del grupo acetilo a la CoA (figs. 5-5 y 5-8) es catalizada por el complejo multienzimático gigante piruvato deshidrogenasa, cuya estructura se mostró en la figura 2-41. El descubrimiento de la acetil-CoA por Fritz Lipmann, en 1961, fue la última pieza en el enigma de la oxidación de la glucosa.

Ciclo del ácido tricarboxílico (ATC)

Una vez formada, la acetil-CoA se introduce a la vía cíclica denominada ciclo del ácido tricarboxílico (ATC), donde oxida al sustrato y conserva su energía. Con excepción de la succinato deshidrogenasa, enlazada a la membrana interna, todas las enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico residen en la fase soluble de la matriz (fig. 5-15). El ciclo del ácido

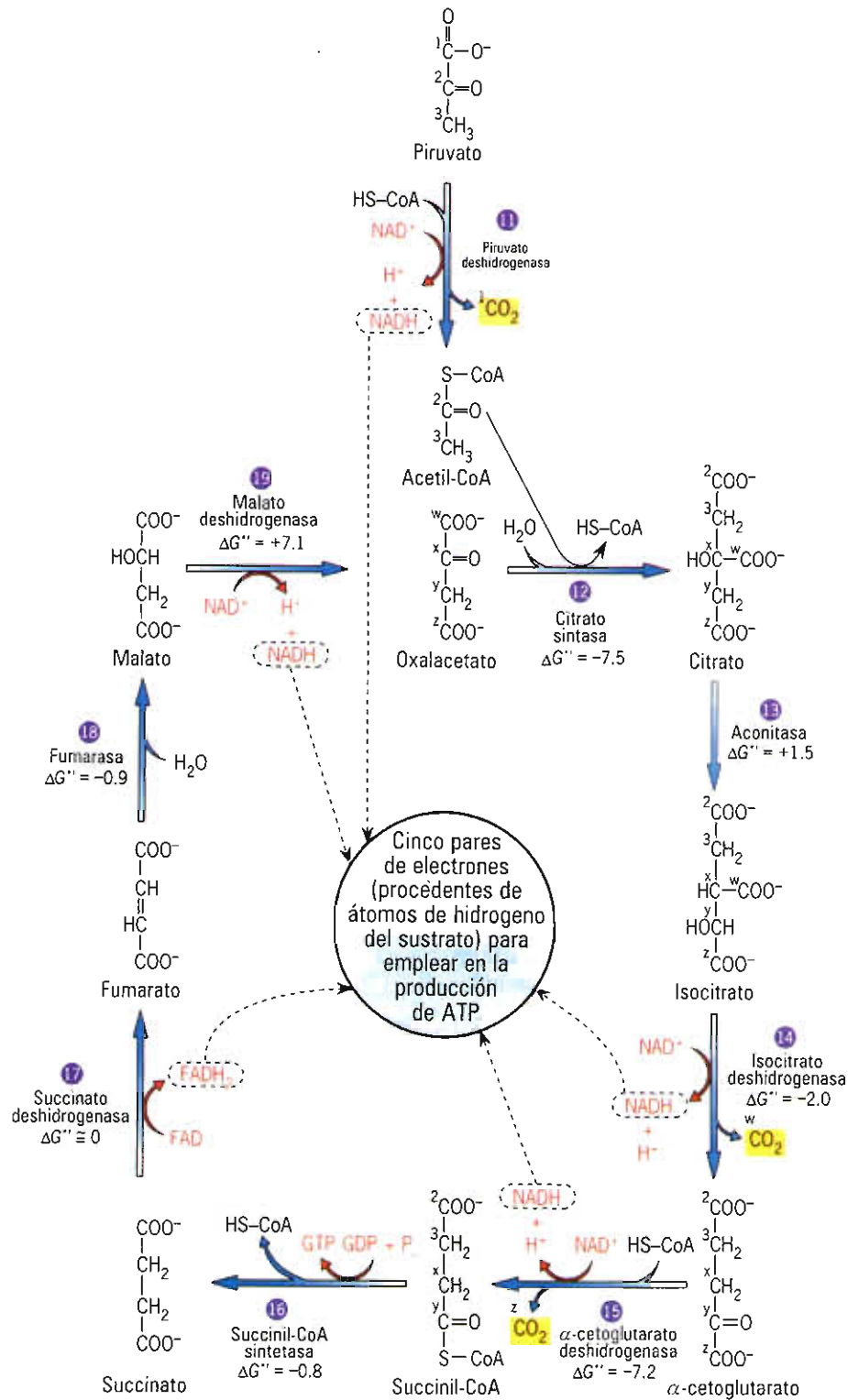
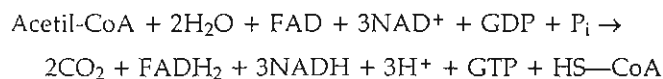


FIGURA 5-8. Ciclo del ácido tricarboxílico, también llamado ciclo de Krebs, nombre del investigador que lo formuló, o ciclo del ácido cítrico por el primer compuesto que se forma en el ciclo. El ciclo se inicia con la condensación de oxalacetato (OAA) y acetil-CoA (reacción 12). Los carbonos de estos compuestos están marcados con números o letras. Los dos carbonos que se pierden durante el paso por el ciclo se derivan del oxalacetato. También se indica la energía libre estándar y el nombre de las enzimas. Los cinco pares de electrones eliminados de las moléculas del sustrato por la piruvato deshidrogenasa y las enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico y transferidas a NAD^+ o FAD pasan a lo largo de la cadena transportadora de electrones y se emplean para producir ATP. Las reacciones aquí mostradas empiezan en el número 11 debido a que la vía continúa donde se separa de la reacción de glucólisis (10 de la figura 3-23).

tricarboxílico también se refiere como ciclo de Krebs, por el bioquímico inglés Hans Krebs, quien trabajó en esta vía en los años de 1930. Irónicamente, cuando Krebs obtuvo por primera vez datos suficientes para apoyar la idea de un ciclo metabólico, escribió un artículo acerca de su investigación y lo envió a la revista británica *Nature*. Varios días después le regresaron el manuscrito acompañado de una carta de rechazo. El editor concluyó que carecía de la suficiente importancia para publicarse en esa revista.

El primer paso del ciclo del ácido tricarboxílico es la condensación del grupo acetilo de dos carbonos con un oxalacetato de cuatro carbonos para formar una molécula de citrato de seis carbonos (fig. 5-8). Durante el ciclo, la molécula de citrato disminuye la longitud de su cadena, un átomo de carbono cada vez, y regenera la molécula de oxalacetato de cuatro carbonos, la cual se condensa con otra acetil-CoA. Estos dos carbonos eliminados durante el ciclo del ácido tricarboxílico (que no son los mismos unidos al grupo acetilo) se oxidan por completo hasta dióxido de carbono. Durante el ciclo del ácido tricarboxílico pueden ocurrir cuatro reacciones, en las cuales se transfiere un par de electrones de un sustrato a una coenzima aceptora de electrones. Tres de las reacciones utilizan NAD^+ para formar NADH, una reacción emplea FAD (derivada de la vitamina riboflavina) para formar FADH_2 . La ecuación neta para la reacción del ciclo del ácido tricarboxílico se puede escribir:



El ciclo del ácido tricarboxílico es la vía central de las células. Si consideramos la posición de dicho ciclo en el metabolismo total de la célula (figs. 5-9 y 3-20), se observa que los metabolitos de este ciclo son los mismos compuestos generados por la mayor parte de las vías catabólicas de la célula. Por ejemplo, acetil-CoA es un producto final importante de un gran número de vías catabólicas, incluyendo la descomposición de ácidos grasos, desdoblados cada vez a unidades de dos carbonos (fig. 5-9, a). Estos compuestos de dos carbonos entran al ciclo del ácido tricarboxílico como acetil-CoA. Hasta ahora se conoce el papel de las mitocondrias en la descomposición de polisacáridos y grasas; pero estos organelos también son importantes en el desdoblamiento de proteínas. Aunque los aminoácidos que constituyen las proteínas forman un conjunto heterogéneo de moléculas, su descomposición también genera metabolitos del ciclo del ácido tricarboxílico (fig. 5-9, b) que llegan a la matriz por medio de sistemas especiales de transporte. Es evidente que todas las macromoléculas que suministran energía a la célula (polisacáridos, grasas y proteínas) se descomponen en metabolitos del ciclo del ácido tricarboxílico. Por lo tanto, las mitocondrias se convierten en el centro donde ocurren los procesos que conservan la energía final del metabolismo, cualquiera que sea la naturaleza del material con el cual se inicia.

Importancia de las coenzimas reducidas en la formación de ATP

A partir de la ecuación neta del ciclo del ácido tricarboxílico es evidente que los productos primarios de las reacciones

del ácido tricarboxílico son las coenzimas reducidas FADH_2 y NADH, que contienen los electrones tomados de diferentes sustratos oxidados. NADH también es un producto primario de la glucólisis. Las mitocondrias no tienen capacidad para importar el NADH formado en el citoplasma mediante glucólisis. En vez de eso, los electrones de NADH se emplean para reducir un metabolito de bajo peso molecular, que entonces: 1) puede entrar a las mitocondrias (a través de una vía denominada vía alterna entre malato y aspartato) y reducir NAD^+ a NADH, o 2) transferir sus electrones a FAD (a través de una vía denominada vía alterna entre glicerol y fosfato, que se muestra en la figura 5-10) para producir FADH_2 .

Ahora que podemos explicarnos la formación de NADH y FADH_2 por la glucólisis y el ciclo del ácido tricarboxílico, volveremos a los pasos que siguen estas coenzimas reducidas para producir ATP. El proceso total se puede dividir en dos etapas distintas.

Etapas 1. *Los electrones pasan desde FADH_2 o NADH a una serie de portadores de electrones que constituyen la cadena de transporte localizada en la membrana mitocondrial interna.* El aceptor terminal de electrones de la cadena respiratoria es el oxígeno molecular (O_2), el cual se reduce para formar agua. Conforme los electrones avanzan a lo largo de la cadena respiratoria, los cambios de conformación en los portadores desplazan protones hacia afuera a través de la membrana mitocondrial interna, estableciendo por lo tanto un gradiente de protones a través de dicha membrana.

Etapas 2. *El movimiento controlado de los protones (H^+) los regresa a través de la membrana por medio de una enzima sintetizadora de ATP que suministra la energía necesaria para efectuar la reacción endérgica que conduce a la síntesis de ATP.*

La importancia de los movimientos de protones en la formación de ATP fue propuesta por primera vez en 1961 por Peter Mitchell, de la Universidad de Edinburgo. Los experimentos que condujeron a la aceptación del *mecanismo quimiosmótico*, como lo llamó Mitchell, se analizan en *La vía experimental* al final de este capítulo; en lo que resta del mismo se hará un análisis más detallado de las dos etapas resumidas antes.

Cada par de electrones transferidos del NADH al oxígeno por medio de la cadena transportadora de electrones libera suficiente energía para formar unas tres moléculas de ATP. Cada par donado por FADH_2 libera bastante energía para formar casi dos moléculas de ATP. Si se suman todas las moléculas de ATP formadas a partir de una molécula de glucosa completamente catabolizada por medio de glucólisis y el ciclo del ácido tricarboxílico, la ganancia neta máxima es de 36 ATP (que incluye el GTP formado en cada vuelta del ciclo, fig. 5-8). Recordemos que la verdadera cantidad de ATP formado por las moléculas oxidadas de glucosa depende de la relación $[\text{ATP}]/[\text{ADP}]$ dentro de la célula y las actividades particulares en las cuales participa la célula. La importancia relativa de la glucólisis en comparación con el ciclo del ácido tricarboxílico, o sea, del metabolismo oxidativo anaerobio comparado con el aerobio en la función

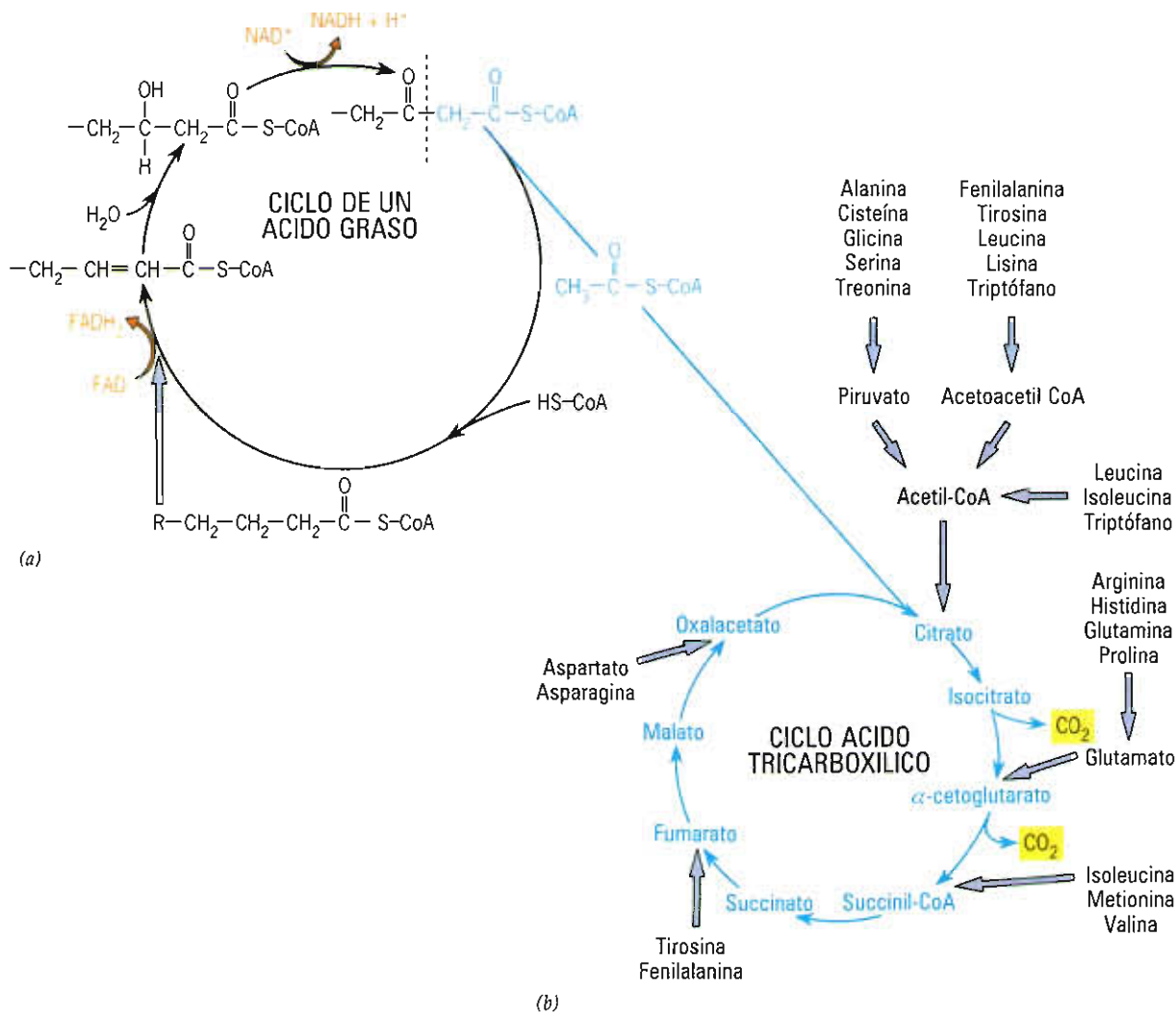


FIGURA 5-9. Las vías catabólicas generan compuestos que ingresan al ciclo del ácido tricarboxílico. *a)* Oxidación de ácidos grasos. El primer paso en la oxidación de un ácido graso es su activación por unión al grupo tiol ($-SH$) de la coenzima A, que ocurre luego que el grupo lipoacil es transportado a través de la membrana mitocondrial interna en asociación a una proteína transportadora. En la mitocondria, la molécula lipoacil-CoA sufre disección gradual, durante la cual se elimina una molécula de acetil-CoA de la cadena de ácido graso con cada vuelta del ciclo. Además de la molécula de acetil-CoA que ingresa al ciclo del ácido tricarboxílico, en cada vuelta del ciclo del ácido graso se produce una de $NADH$ y una $FADH_2$. Del examen de esta serie de reacciones es evidente la razón por la cual las grasas constituyen un rico almacén de energía química. *b)* Ingreso de aminoácidos al ciclo del ácido tricarboxílico.

del músculo esquelético humano, se analiza en *La perspectiva humana*.

5-3 Papel de las mitocondrias en la formación de ATP

Con frecuencia se describe a las mitocondrias como “plantas en miniatura generadoras de energía”. Igual que dichas plantas generadoras, las mitocondrias extraen energía de materiales orgánicos y la almacenan en forma de energía eléctrica. Más específicamente, la energía extraída de los sustratos se emplea para generar un gradiente iónico a través de la membrana mitocondrial interna. Este gradiente iónico re-

presenta una forma de energía que puede liberarse para efectuar diferentes tipos de trabajo. En el capítulo 4 se vio cómo las células intestinales emplean un gradiente iónico a través de su membrana plasmática para transportar azúcares y aminoácidos fuera de la luz intestinal, en tanto que las células nerviosas utilizan un gradiente similar como base para generar impulsos nerviosos. El uso de gradientes iónicos como forma de intercambiar energía requiere varios componentes, incluyendo un sistema para generar el gradiente, una membrana capaz de mantener el gradiente y el mecanismo para liberar el gradiente de modo que pueda efectuar trabajo.

Las mitocondrias utilizan un gradiente iónico a través de su membrana interna para efectuar gran número de acti-

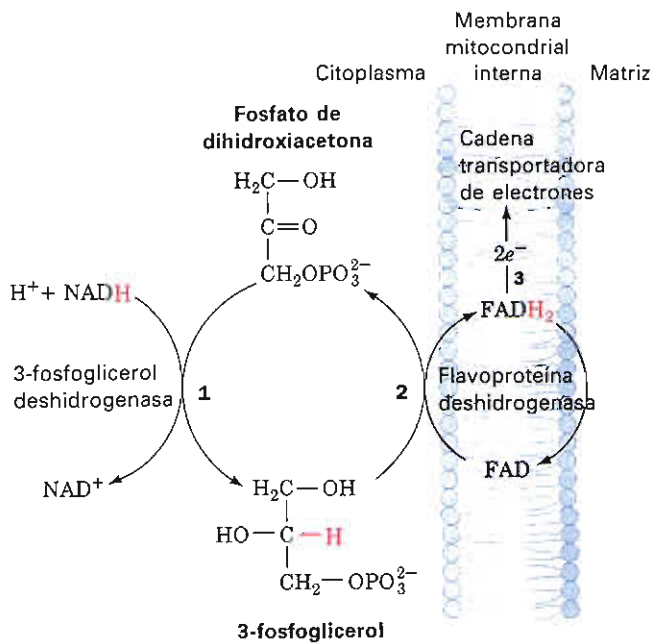


FIGURA 5-10. Intercambio de glicerol fosfato. El NADH producido en el citosol no puede atravesar la membrana mitocondrial interna. En el intercambio de glicerol fosfato que aquí se muestra, los electrones se transfieren al fosfato de dihidroxiacetona para formar 3-fosfoglicerol, que a continuación transfiere los electrones a una molécula de FAD dentro de la membrana mitocondrial interna. El FADH_2 formado en la reacción puede pasar los electrones a través de la cadena transportadora de electrones.

vidades que requieren energía, principalmente síntesis de ATP. Cuando la formación de ATP se realiza por la energía liberada de los electrones eliminados durante la oxidación del sustrato, el proceso se denomina **fosforilación oxidativa**. La fosforilación oxidativa se puede comparar con la fosforilación a nivel de sustrato, según se estudia en la página 102, en la cual el ATP se forma directamente por transferencia de un grupo fosfato procedente de una molécula del sustrato al ADP. Desentrañar el mecanismo básico de la fosforilación oxidativa ha sido uno de los logros más significativos en el campo de la biología celular; las brechas de conocimiento que todavía falta por llenar aún constituyen un área activa de investigación. Para comprender el mecanismo de la fosforilación oxidativa primero es necesario considerar de qué manera la oxidación del sustrato puede liberar energía libre.

Potenciales de oxidorreducción

Si se comparan varios agentes oxidantes, pueden clasificarse en series según su afinidad por los electrones: cuanto mayor sea la afinidad, más fuerte será el agente oxidante. También los agentes reductores se pueden clasificar según su afinidad para electrones: a menor afinidad (los electrones se liberan más fácilmente), más fuerte será el agente reductor. Para poner esto en términos cuantitativos, los agentes reductores se clasifican según su **potencial de transferencia de electro-**

nes; las sustancias que tienen un potencial elevado para transferir electrones, como el NADH , son agentes reductores fuertes, en tanto que aquellas con bajo potencial para transferir electrones, como H_2O , son agentes reductores débiles. Los agentes oxidantes y reductores se presentan en pares, como NAD^+ y NADH . Los agentes reductores fuertes se unen a los agentes oxidantes débiles, y viceversa. Por ejemplo, NAD^+ (del par $\text{NADH}-\text{NAD}^+$) es un agente oxidante débil, en tanto que el otro miembro del par H_2O , o sea el oxígeno (en realidad $\frac{1}{2}\text{O}_2$), es un agente oxidante fuerte.

Puesto que el movimiento de electrones genera separación de cargas, la afinidad de las sustancias por los electrones se puede medir con instrumentos que detectan voltaje (fig. 5-11). En cada par se mide su **potencial de oxidorreducción** (o **potencial redox**) para relacionarlo con el potencial de algún par estándar. Arbitrariamente se eligió el hidrógeno como par estándar. Igual que para cambios de energía libre, donde el cambio estándar de energía libre es ΔG° , para los pares redox se emplea una nomenclatura similar. El potencial redox estándar, E_0 , para un par dado se designa como el voltaje producido por una media celdilla (sólo están presentes los miembros de un par), en la cual cada miembro del par se encuentra en concentración y condiciones estándar (como en la figura 5-11). Las concentraciones estándar son 1.0 M para solutos y iones y 1 atm de presión para gases (p. ej., H_2) a 25°C . El potencial redox estándar para una reacción de oxidorreducción que implique hidrógeno ($2\text{H}^+ + 2\text{electrones} \rightarrow \text{H}_2$) es 0.00 V. La asignación de un signo (positivo o negativo) a pares diferentes del par hidrógeno es arbitraria y varía entre las diversas disciplinas. Consideraremos la asignación de la siguiente manera. Aquellos pares

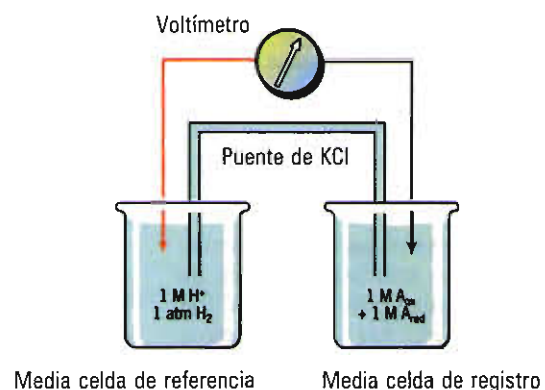
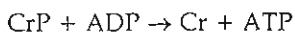


FIGURA 5-11. Medición del potencial estándar de oxidorreducción. La media celda de muestra contiene los miembros oxidados y reducidos del par, ambos presentes a 1 M. La media celda de referencia contiene una solución 1 M de H^+ en equilibrio con el gas hidrógeno a una atmósfera de presión. El circuito eléctrico se forma conectando las medias celdas a través de un voltímetro y un puente salino. Si los electrones fluyen preferencialmente desde la media celda de muestra a la media celda de referencia, entonces el potencial redox estándar (ΔE_0) del par muestra es negativo; si los electrones fluyen en la dirección opuesta, el potencial redox estándar del par muestra es positivo. El puente salino consiste en una solución saturada de KCl ; proporciona una vía para que los contraiones se muevan entre las medias celdas y conserven la neutralidad eléctrica en los dos comparimientos.

LA PERSPECTIVA HUMANA

Papel del metabolismo anaerobio y aerobio en el ejercicio

La contracción muscular requiere una gran cantidad de energía. La mayor parte de esta energía se emplea para lograr que los filamentos que contienen actina y miosina se deslicen uno sobre otro, como analizaremos en el capítulo 9. La energía necesaria para la contracción muscular se deriva del ATP. La velocidad de hidrólisis del ATP aumenta más de 100 veces en un músculo esquelético sometido a contracción máxima, en comparación con el mismo músculo en reposo. Se estima que en promedio el músculo esquelético humano tiene suficiente ATP "a la mano" para consumir durante una contracción vigorosa de 2 a 5 segundos de duración. Aunque el ATP se hidroliza, es importante producir al mismo tiempo ATP adicional; de otra manera, la proporción ATP/ADP desciende y también se reduce la energía libre disponible para sostener la contracción. Las células musculares contienen una reserva de fosfato de creatina (CrP), uno de los compuestos con potencial para transferir fosfatos mayor que el del ATP (fig. 3-27) y que por lo tanto puede utilizarse para generar ATP en la siguiente reacción.



En condiciones típicas, el músculo esquelético tiene suficiente reserva de fosfato de creatina para mantener una concentración elevada de ATP durante casi 15 segundos. Puesto que las células musculares tienen un suministro muy limitado tanto de ATP como de fosfato de creatina, se deduce que la actividad muscular intensa o sostenida requiere de la síntesis de cantidades adicionales de ATP, que deben obtenerse mediante metabolismo oxidativo.

El músculo esquelético humano consta de dos tipos generales de fibras (fig. PH 5-1): fibras de "contracción rá-



FIGURA PH 5-1. El músculo esquelético contiene una mezcla de fibras de contracción rápida (teñidas en color oscuro) y fibras de contracción lenta (teñidas en color claro). (Cortesía de Duncan MacDougall.)

pida", que se contraen con gran rapidez (p. ej., 15 a 40 msec) y fibras de "contracción lenta" que se contraen más lentamente (p. ej., 40 a 100 msec). El microscopio electrónico revela que las fibras de contracción rápida están casi desprovistas de mitocondrias, lo que indica que dichas células no pueden producir mucho ATP mediante respiración aerobia. Por otra parte, las fibras de contracción lenta contienen un gran número de mitocondrias. Estos dos tipos de fibras del músculo esquelético son adecuadas para actividades de diferentes tipos. Por ejemplo, levantar pesas o correr a gran velocidad depende principalmente de las fibras de contracción rápida, capaces de generar más fuerza que sus contrapartes de contracción lenta. Las fibras de contracción rápida producen casi todo su ATP por la vía anaerobia como resultado de la glucólisis. Aunque la glucólisis sólo tiene capacidad para producir cerca de 5% de ATP *por molécula de glucosa oxidada* en comparación con la respiración aerobia, las reacciones de la glucólisis

ocurren con mayor rapidez que las del ciclo del ácido tricarboxílico y el transporte de electrones, por lo que la velocidad de producción de ATP por la vía anaerobia es en realidad más alta que la lograda en la respiración aerobia. Los problemas de producir ATP por glucólisis son el desgaste rápido de la glucosa disponible en la fibra (almacenada en forma de glucógeno) y la producción de un producto final indeseable, el ácido láctico. Consideraremos este último aspecto con mayor detalle.

Debemos recordar que la glucólisis sólo continúa si el NAD^+ se regenera y que eso ocurre por fermentación. Las células musculares regeneran NAD^+ al reducir piruvato, el producto final de la glucólisis, a ácido láctico. La mayor parte del ácido láctico difunde fuera de las células musculares activas hacia la sangre circulante, donde es transportado al hígado para convertirse de nuevo en glucosa. La glucosa producida en el hígado se libera al torrente sanguíneo y por lo tanto puede regresar al músculo activo y continuar suministrando energía para efectuar la glucólisis acelerada. Sin embargo, la formación de ácido láctico se acompaña de un descenso de pH dentro del tejido muscular (desde pH 7.0 hasta 6.35), lo que a veces produce el dolor y los calambres que acompañan al ejercicio intenso. El incremento de la acidez junto con el agotamiento de las reservas de glucosa tal vez explique la sensación de fatiga muscular característica del ejercicio anaerobio.

Si en lugar de emplear los músculos para levantar pesas o efectuar carreras se participa en un ejercicio "aerobio", como montar bicicleta o caminar con rapidez, la actividad puede prolongarse durante periodos mucho más largos sin la sensación de dolor muscular o de fatiga. Los ejercicios aerobios, como su nombre implica, están

diseñados para permitir que los músculos trabajen por la vía aerobia, o sea, continuar la producción del ATP necesario mediante el transporte de electrones. Los ejercicios aerobios dependen principalmente de la contracción de fibras lentas del músculo esquelético, capaces de generar menos fuerza, pero que pueden continuar funcionando durante largos periodos debido a la producción aerobia continua de ATP sin la formación correspondiente de ácido láctico.

El ejercicio aerobio recibe su combustible inicial de las moléculas de glucosa almacenadas como glucógeno en los propios músculos, pero luego de unos pocos minutos los músculos dependen más y más de los ácidos grasos libres liberados en la sangre por el tejido adiposo (grasa). Cuanto mayor sea el periodo de ejercicio, mayor la dependencia de ácidos grasos. Se estima

que casi 50% de las calorías consumidas por los músculos en 20 minutos de ejercicio aerobio intenso se derivan de la grasa. Ejercicios aerobios como trotar, caminar rápido, nadar o montar bicicleta constituyen una de las mejores formas de reducir el contenido de grasa del cuerpo.

La proporción entre fibras de contracción rápida y fibras de contracción lenta varía de un músculo a otro. Por ejemplo, los músculos posturales de la espalda, necesarios para que una persona permanezca en posición erecta, contienen una mayor proporción de fibras de contracción lenta en comparación con los músculos del brazo empleados para tirar o levantar objetos. La proporción precisa entre fibras de contracción rápida y fibras de contracción lenta en un músculo particular está genéticamente determinada y es muy variable de una persona a otra: factores

que desempeñan un importante papel para permitir que un individuo alcance la excelencia en ciertos tipos de actividad física. Por ejemplo, los corredores de velocidad y los levantadores de pesas mundiales suelen tener mayor proporción de fibras musculares de contracción rápida en comparación con los corredores de distancias largas. Además, el entrenamiento para deportes como levantamiento de pesas conduce a un crecimiento desproporcionado de las fibras de contracción rápida.

El tejido del músculo cardíaco también debe incrementar su grado de actividad durante el ejercicio intenso, pero a diferencia del tejido del músculo esquelético, el músculo cardíaco sólo puede producir ATP por metabolismo aerobio. En realidad, casi 40% del espacio citoplásmico de una célula muscular cardíaca humana está ocupado por mitocondrias que producen ATP.

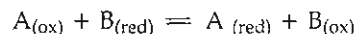
cuyos agentes reductores son mejores donadores de electrones en comparación con H_2 , o sea, con menor afinidad por sus electrones en comparación con H_2 , se les asigna potenciales redox negativos. Por ejemplo, el potencial redox estándar para el par $NADH-NAD^+$ es de -0.32 V (cuadro

CUADRO 5-1. Potenciales redox estándar de reacciones seleccionadas en un sentido

Ecuación de electrodo	$E'_0(V)$
Acetato + $2H^+$ + $2e^-$ $\rightleftharpoons$ acetaldehído	-0.58
$2H^+$ + $2e^-$ $\rightleftharpoons$ H_2	-0.421
α -cetoglutarato + CO_2 + $2H^+$ + $2e^-$ $\rightleftharpoons$ isocitrato	-0.38
Acetoacetato + $2H^+$ + $2e^-$ $\rightleftharpoons$ β -hidroxibutirato	-0.346
NAD^+ + $2H^+$ + $2e^-$ $\rightleftharpoons$ $NADH$ + H^+	-0.320
$NADP^+$ + $2H^+$ + $2e^-$ $\rightleftharpoons$ $NADPH$ + H^+	-0.324
Acetaldehído + $2H^+$ + $2e^-$ $\rightleftharpoons$ etanol	-0.197
Piruvato + $2H^+$ + $2e^-$ $\rightleftharpoons$ lactato	-0.185
Oxalacetato + $2H^+$ + $2e^-$ $\rightleftharpoons$ malato	-0.166
FAD + $2H^+$ + $2e^-$ $\rightleftharpoons$ $FADH_2$ (en flavoproteínas)	+0.031
Fumarato + $2H^+$ + $2e^-$ $\rightleftharpoons$ succinato	+0.031
2 citocromo $b_{K(ox)}$ + $2e^-$ $\rightleftharpoons$ 2 citocromo $b_{K(red)}$	+0.030
Ubiquinona + $2H^+$ + $2e^-$ $\rightleftharpoons$ ubiquinol	+0.10
2 citocromo c_{ox} + $2e^-$ $\rightleftharpoons$ 2 citocromo c_{red}	+0.254
2 citocromo $a_{3(ox)}$ + $2e^-$ $\rightleftharpoons$ 2 citocromo $a_{3(red)}$	+0.385
$\frac{1}{2}O_2$ + $2H^+$ + $2e^-$ $\rightleftharpoons$ H_2O	+0.816

5-1). Los pares cuyos agentes oxidantes sean mejores aceptores de electrones que H^+ , o sea, que presenten mayor afinidad para electrones en comparación con H^+ , tienen potenciales redox positivos. En el cuadro 5-1 se muestran los potenciales redox de algunos pares biológicamente importantes. En dicho cuadro el valor del par hidrógeno no es 0.00, sino $-0.42V$. Esta cifra representa el valor cuando la concentración de H^+ es 10^{-7} M (pH 7.0) en vez de 1.0 M (pH 0.0), que sería poco empleada en fisiología. Si el potencial redox estándar se calcula a pH 7, entonces se indica por el símbolo E'_0 en vez de E_0 .

Así como cualquier otra reacción espontánea se acompaña de pérdida de energía libre, lo mismo ocurre con las reacciones de oxidorreducción. El cambio de energía libre estándar durante una reacción de este tipo

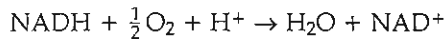


se puede calcular a partir de los potenciales redox estándar de los dos pares implicados en la reacción según la ecuación

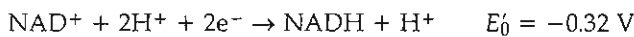
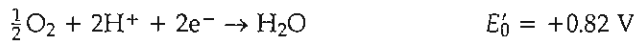
$$\Delta G^{\circ'} = -nF \Delta E'_0$$

donde n es el número de electrones transferidos, F es la constante de Faraday ($23.063\text{ kcal/V}\cdot\text{mol}$) y $\Delta E'_0$ es la diferencia en voltios entre el potencial redox estándar de los dos pares. Cuanto mayor sea la diferencia de potencial redox estándar entre los dos pares, más tiempo procederá la reacción para formar productos en condiciones estándar antes de alcanzar un estado de equilibrio.

Para la oxidación de NADH por oxígeno molecular,



los potenciales redox estándar de los dos pares se pueden escribir de la siguiente manera



El cambio de voltaje para la reacción total es igual a la diferencia entre los dos valores E'_0 ($\Delta E'_0$):

$$\Delta E'_0 = +0.82 \text{ V} - (-0.32 \text{ V}) = +1.14 \text{ V}$$

que es una medida de la energía libre liberada cuando se oxida NADH por oxígeno molecular en condiciones estándar. Sustituyendo este valor en la ecuación anterior,

$$\Delta G^{\circ'} = (-2)(23.063 \text{ kcal/V} \cdot \text{mol})(1.14 \text{ V}) = -52.6 \text{ kcal/mol}$$

La diferencia de energía libre estándar ($\Delta G^{\circ'}$) es -52.6 kcal/mol . Igual que con otras reacciones, el verdadero valor ΔG depende de las concentraciones relativas de reactantes y productos (formas oxidadas y reducidas de los compuestos) presentes en la célula en un momento dado. No obstante, pareciera que el descenso de energía libre de un par de electrones conforme pasan de NADH a oxígeno molecular ($\Delta G^{\circ'} = -52.6 \text{ kcal/mol}$) es suficiente para formar varias moléculas de ATP ($\Delta G^{\circ'} = +7.3 \text{ kcal/mol}$) incluso cuando la relación ATP/ADP dentro de la célula es mucho más alta que en condiciones estándar. En las mitocondrias, la transferencia de energía del NADH al ATP ocurre de manera gradual y será el principal tema que se exponga en el resto de este capítulo.

Dentro de las mitocondrias, los electrones se transfieren al NAD^+ (o al FAD) a partir de varios sustratos del ciclo del ácido tricarboxílico, principalmente isocitrato, α -cetoglutarato, malato y succinato. Los primeros tres de estos intermediarios poseen potenciales redox de valor negativo relativamente alto (cuadro 5-1), lo suficientemente alto para transferir electrones a NAD^+ en las condiciones prevalecientes en la célula.¹ En contraste, la concentración de succinato a fumarato, que tiene un potencial redox más positivo, procede por la reducción de FAD, una coenzima con mayor afinidad por electrones en comparación con NAD^+ .

Transporte de electrones

La mayor parte de las enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico se encuentran libres dentro de la matriz fluida de la mitocondria. El NADH formado en la matriz se disocia de

su respectiva deshidrogenasa y transfiere sus electrones a otros transportadores relacionados con la membrana mitocondrial interna. Cada uno de los casi 20 transportadores de electrones que constituyen la cadena transportadora puede existir en su estado reducido u oxidado. Cada transportador se reduce sucesivamente porque gana electrones procedentes del transportador precedente en la cadena y a continuación se oxida porque dona sus electrones al transportador subsecuente (fig. 5-14). Por lo tanto, los electrones pasan de un transportador al siguiente hasta que el aceptor final se reduce. El aceptor final de esta "cadena de cubetas" de electrones es el O_2 , el cual se reduce para formar agua. A lo largo de la línea cada transportador de electrones tiene un potencial redox más positivo que el transportador previo, y en cada transferencia sucesiva los electrones pierden energía libre adicional. La energía libre liberada por la transferencia de electrones se emplea para generar un gradiente de protones, el cual se utiliza posteriormente para efectuar la síntesis endergónica de ATP.

Tipos de transportadores

La **cadena de transporte de electrones** (o **cadena respiratoria**) de la membrana mitocondrial interna se compone de cuatro tipos de transportadores de electrones enlazados a la membrana: flavoproteínas, citocromos, ubiquinona, y proteínas de hierro y azufre. Con excepción de la ubiquinona, todos los centros redox dentro de la cadena respiratoria que aceptan y donan electrones son *grupos prostéticos* (componentes no aminoácidos) relacionados con proteínas.

Las **flavoproteínas** constan de un polipéptido fuertemente enlazado a uno de los grupos prostéticos relacionados, sea dinucleótido de adenina flavina (FAD) o mononucleótido de flavina (FMN) (fig. 5-12, a). Los grupos prostéticos de las flavoproteínas se derivan de la riboflavina (vitamina B_2) y cada uno puede aceptar y donar dos protones y dos electrones. El estado de oxidación de la flavoproteína puede determinarse por métodos espectroscópicos midiendo la cantidad de luz absorbida a diferentes longitudes de onda. Las proteínas totalmente oxidadas muestran un máximo de absorción a 370 y 450 nm, en tanto que los grupos reducidos sólo tienen un máximo a 370 nm. Las principales flavoproteínas de las mitocondrias son la NADH deshidrogenasa de la cadena transportadora de electrones y la succinato deshidrogenasa del ciclo del ácido tricarboxílico.

Los **citocromos** son proteínas que contienen grupos *hem* (como el descrito para la mioglobina en la página 58). El átomo de hierro de un hem puede sufrir una transición reversible entre los estados de oxidación Fe^{3+} y Fe^{2+} como consecuencia de la aceptación y pérdida de un solo electrón (fig. 5-12, b). Hay cuando menos cinco especies de citocromos presentes en la cadena transportadora de electrones, *a*, *a*₃, *b*, *c* y *c*₁, que difieren entre sí por las sustituciones efectuadas en el grupo hem (indicada por las porciones sombreadas de la figura 5-12, b) y también por la secuencia de aminoácidos de la cadena del polipéptido. Los grupos hem de la citocromo oxidasa también se relacionan con iones cobre que pueden desempeñar un papel clave en la transferencia de electrones a O_2 (fig. 5-19).

La ubiquinona (UQ, o coenzima Q) es una molécula liposoluble que contiene una larga cadena hidrófoba com-

¹ Según se indica en el cuadro 5-1, el potencial redox estándar (E'_0) del par oxalacetato-malato es más positivo que el del par NAD^+ -NADH. Por lo tanto, la oxidación de malato a oxalacetato sólo puede proceder a la formación de oxalacetato cuando la relación de productos reactantes se conserva por debajo de las condiciones estándar. La ΔG de esta reacción se conserva negativa manteniendo elevadas las concentraciones de malato o de NAD^+ en relación con las de oxalacetato o NADH en la región que rodea al sitio activo de la enzima. La situación es análoga a la observada en la formación de gliceraldehído 3-fosfato a partir de dihidroxiacetona fosfato (pág. 84).

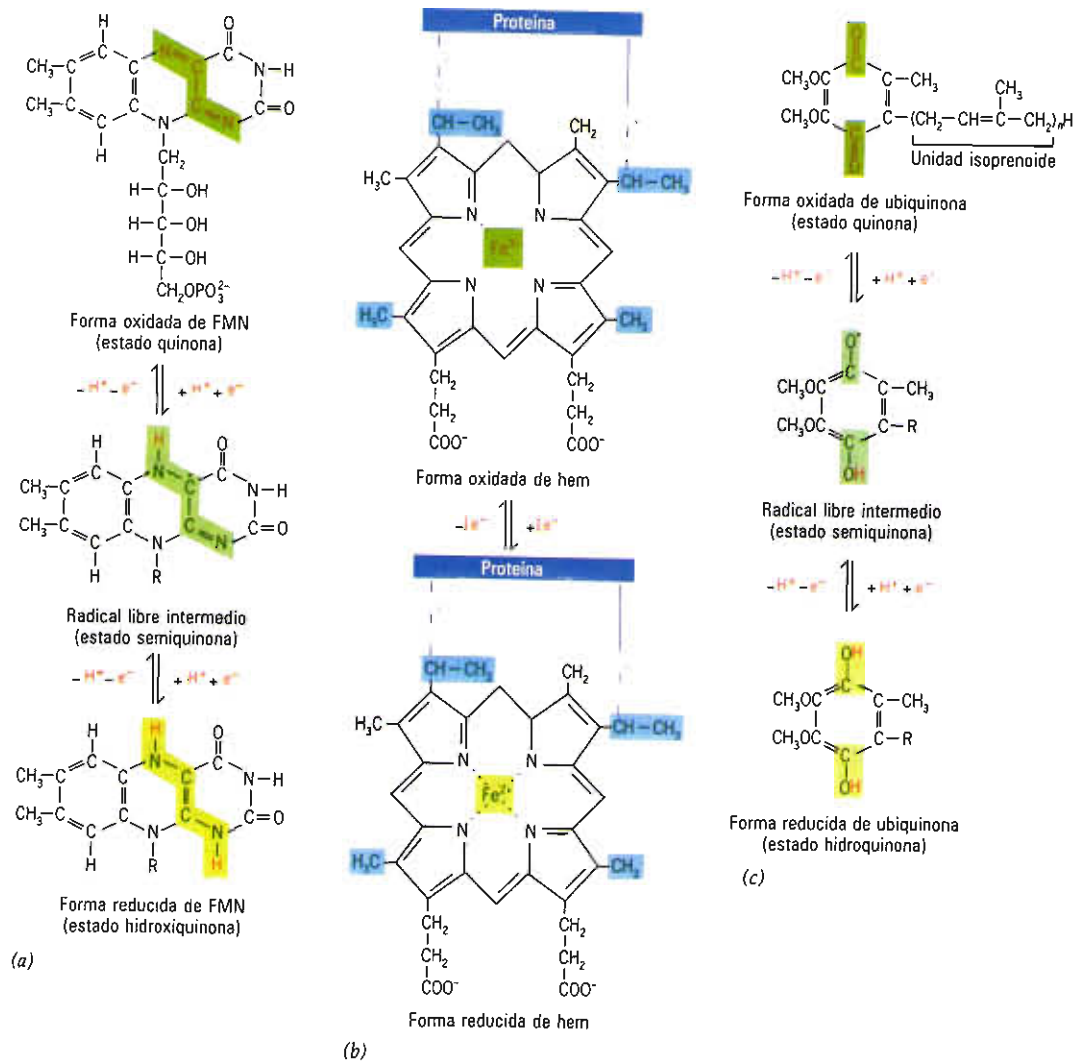


FIGURA 5-12. Estructura de las formas oxidada y reducida de los tres tipos de transportadores de electrones. a) FMN de la NADH deshidrogenasa; b) el grupo hem del citocromo c, y c) ubiquinona (coenzima Q). Los grupos hem de los diferentes citocromos de la cadena transportadora de electrones difieren en sus grupos sustituidos sobre el anillo porfirina (indicados por el sombreado) y la naturaleza del enlace a la proteína. Los citocromos sólo pueden aceptar un electrón, en tanto que FMN y quinonas pueden aceptar dos electrones y dos protones y pueden hacerlo en reacciones sucesivas, como se muestra en la figura. FAD difiere de FMN en que contiene un grupo adenosina unido al fosfato.

puesta por unidades isoprenoideas de cinco carbonos (fig. 5-12, c). Igual que las flavoproteínas, cada ubiquinona puede aceptar y donar dos electrones y dos protones. Similar a flavoproteínas y citocromos, la ubiquinona se puede detectar espectroscópicamente debido a que posee una banda de absorción a 280 nm que desaparece en el estado reducido.

A principios del decenio de 1960 se descubrió un nuevo grupo de transportadores de electrones en la membrana interna. Estos componentes, llamados **proteínas de hierro y azufre**, se descubrieron mediante resonancia electrónica de giro (el hierro reducido tiene un electrón impar que da lugar a una señal electrónica de giro). Los átomos de hierro de las proteínas de hierro y azufre no se localizan en un grupo hem, sino que están íntimamente unidos a átomos de azufre

inorgánico como parte de un *centro de hierro y azufre*. Los centros más comunes contienen dos o cuatro átomos de hierro y de azufre, designados [2Fe-2S] y [4Fe-4S], unidos a la proteína en los residuos de cisteína (fig. 5-13). Un solo centro puede tener varios átomos de hierro, pero todo el complejo sólo puede aceptar y donar un electrón. El potencial redox de un centro de hierro y azufre depende mucho de los residuos aminoácidos que constituyen su entorno local; como grupo, las proteínas de hierro y azufre presentan potenciales que varían de -400 mV hasta +300 mV, correspondiendo a una mayor porción del espacio en el que ocurre el transporte de electrones. Se ha identificado más de una docena de proteínas de hierro y azufre dentro de las mitocondrias y todas están íntimamente relacionadas con otros portadores de electrones.

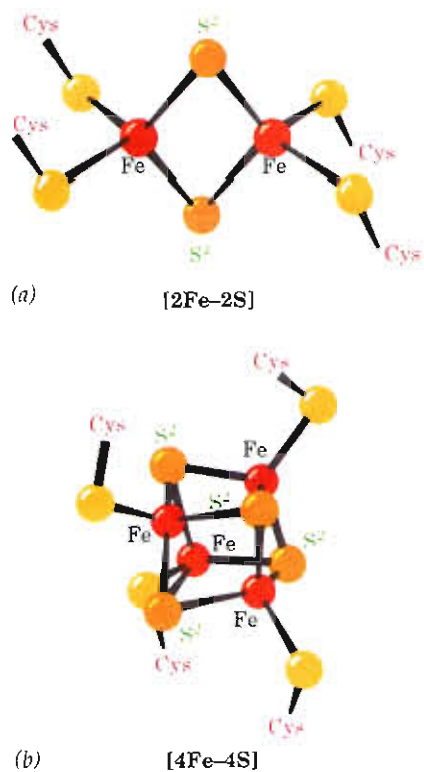


FIGURA 5-13. Centros de hierro y azufre. Estructura de un centro de hierro y azufre: a) [2Fe-2S] y b) [4Fe-4S]. Los átomos de azufre se muestran en color amarillo. Ambos tipos de centros de hierro y azufre están unidos a la proteína por medio de un enlace entre un átomo de azufre (mostrados en color amarillo brillante) y un residuo de cisteína. Los dos tipos de centros de hierro y azufre sólo aceptan un electrón, cuya carga se distribuye entre los diferentes átomos de hierro.

Los portadores de la cadena de transporte de electrones se disponen espacialmente en orden decreciente de potencial iónico, asegurando que los electrones pasen a través de toda la cadena conforme fluyen de NADH o FADH₂ hacia O₂ (fig. 5-14). La secuencia específica de los portadores que constituyen la cadena para el transporte de electrones fue estudiada por Britton Chance y sus colaboradores, en la Universidad de Pennsylvania, empleando varios inhibidores que bloquean el transporte de electrones en sitios específicos a lo largo de la vía. Durante el bloqueo, los portadores sobre el lado NADH incrementan componentes en estado reducido, en tanto que los portadores sobre el lado del oxígeno los acumulan en estado oxidado. Mediante análisis espectroscópico de la naturaleza de los componentes reducidos y oxidados en presencia de diferentes inhibidores se pudo determinar la secuencia de los portadores. En la figura 5-15 se muestra una analogía del concepto de los experimentos con inhibidores. La secuencia de los portadores determinada experimentalmente concuerda bastante bien con las predicciones teóricas basadas en el potencial redox de pares individuales, indicados en el cuadro 5-1.

La velocidad de transferencia de electrones desde un portador a un aceptor depende de la distancia entre los dos centros redox y la vía particular utilizada. Los estudios in-

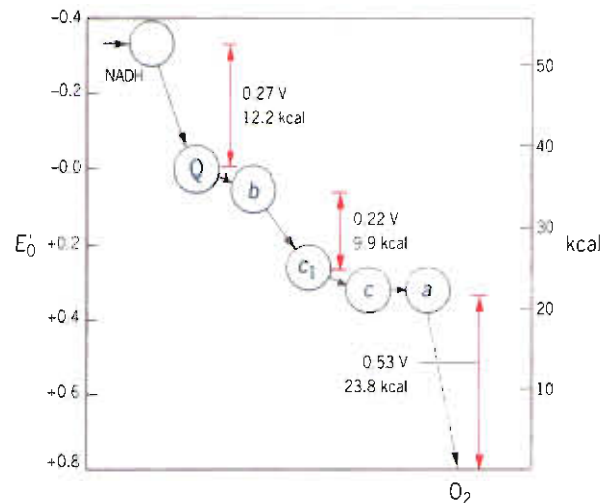


FIGURA 5-14. Disposición de varios portadores en la cadena transportadora de electrones. El diagrama ilustra el potencial redox aproximado de los portadores y la disminución de energía libre conforme los pares de electrones se desplazan a lo largo de la cadena respiratoria hasta el oxígeno. El gran número de centros de hierro y azufre no se indica en la figura, para simplificar. Como analizaremos más adelante en el capítulo, cada uno de los tres segmentos marcados por flechas rojas produce suficiente energía para mover los protones a través de la membrana mitocondrial interna, la cual a su vez suministra la energía requerida para generar ATP a partir de ADP. (Según A.L. Lehninger, Biochemistry, 2a. edición, 1975, Worth Publishers, Nueva York.)

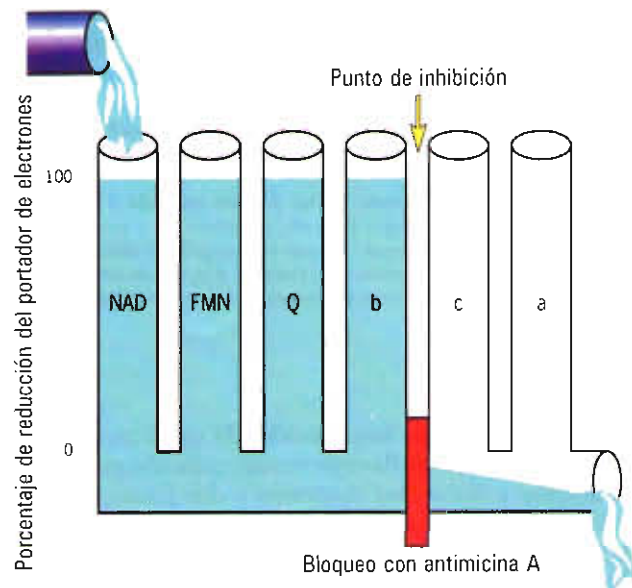


FIGURA 5-15. Uso experimental de inhibidores para determinar la secuencia de portadores en la cadena de transporte de electrones. En esta analogía hidráulica, el tratamiento de las mitocondrias con el inhibidor antimicina A interrumpe el transporte, y a partir del punto de inhibición los portadores del lado NADH permanecen en estado totalmente reducido y los portadores del lado O₂ en estado completamente oxidado. Comparando el efecto de varios inhibidores se pudo establecer el orden de los portadores dentro de la cadena. (Según A.L. Lehninger, Biochemistry, 2a. edición, 1975, Worth Publishers, Nueva York.)

dican que los electrones pueden viajar distancias considerables (10 a 20 Å) entre centros redox adyacentes y los que fluyen a través de "túneles" especiales constituidos por una serie de enlaces covalentes y puentes de hidrógeno que amplían transversalmente algunas partes de diferentes residuos de aminoácidos. Un ejemplo de la vía propuesta se refiere al citocromo *c* y se muestra en la figura 5-16.

Transportadores complejos de electrones

Cuando la membrana mitocondrial interna se rompe pueden aislarse los diferentes portadores de electrones que forman parte de cuatro complejos asimétricos distintos que rodean a la membrana, identificados como complejos I, II, III y IV (fig. 5-17). Dos componentes de la cadena de transporte de electrones, citocromo *c* y ubiquinona, no forman parte de alguno de los cuatro complejos, sino que existen de manera independiente en la membrana. La ubiquinona ocurre como un grupo de moléculas disueltas en la bicapa de lípidos y el citocromo *c* como una proteína periférica de la membrana. Se piensa que el citocromo *c* y la ubiquinona se desplazan dentro de la membrana o a lo largo de la misma transportando electrones entre los grandes complejos proteínicos relativamente inmóviles. Una vez dentro de uno de los grandes complejos multiproteínicos se cree que los electrones viajan a lo largo de vías definidas (del tipo ilustrado en la figura 5-16) entre centros redox adyacentes cuyas posiciones están en sus respectivos lugares.

Si el donador de electrones es NADH, los electrones entran a la cadena respiratoria por la vía del complejo I, que transfiere electrones a la ubiquinona (fig. 5-17). Cuando el donador es FADH₂, los electrones pasan directamente de la succinato deshidrogenasa del ciclo del ácido tricarboxílico (que constituye el complejo II) a la ubiquinona, pasando por alto el extremo "izquierdo" de la cadena que posee un potencial redox demasiado negativo para aceptar los electrones menos energéticos del nucleótido de flavina.

Si se examinan los potenciales redox de portadores sucesivos en la figura 5-14, es evidente que hay tres sitios en los cuales la transferencia de electrones se acompaña de mayor liberación de energía libre (del orden de 200 mV). Cada uno de estos sitios se encuentra entre portadores que son parte de uno de los tres complejos, I, III y IV. La energía libre liberada en forma de electrones que pasa a través de estos tres sitios se conserva mediante translocación de protones desde la matriz a través de la membrana interna al espacio intermembrana. La translocación de protones por estos complejos transportadores de electrones establece el gradiente de protones que efectúan la síntesis de ATP. La capacidad de los complejos I, III y IV para actuar como unidades independientes transportadoras de protones se puede demostrar purificando cada uno de ellos e incorporándolos individualmente en vesículas artificiales de lípidos. Cuando se les suministra el donador apropiado de electrones, estas vesículas que contienen proteínas son capaces de aceptar electrones y translocar protones a través de la membrana vesicular. El mecanismo de la translocación de protones (H⁺) se analiza en las páginas 190 y 200. Examinaremos brevemente cada uno de los cuatro complejos.

Complejo I (NADH-UQ oxirreductasa o NADH deshidrogenasa). El complejo I, que cataliza la transferencia de



FIGURA 5-16. Vías semejantes a túneles para los electrones del complejo levadura-citocromo *c*-citocromo *c* peroxidasa. El grupo hem del citocromo *c* peroxidasa (que no es un portador de la cadena mitocondrial para transporte de electrones, pero que constituye un aceptador análogo de electrones y del cual se conoce su estructura cristalina con estudios de alta resolución) se observa en rojo. Existen varias vías definidas (amarillas) para el movimiento de electrones de un grupo hem al otro. (Por Jeffrey J. Regan, según David N. Beratan y cols., reimpreso con autorización de Science 258:1741, 1992. © 1992 por American Association for the Advancement of Science.)

un par de electrones del NADH a la ubiquinona (UQ), es enorme, contiene hasta 30 polipéptidos distintos y representa una masa de casi un millón de daltons. El complejo I incluye hasta nueve centros distintos de hierro y azufre además de flavoproteína. El paso de electrones a través del complejo I se acompaña de la translocación de protones al interior del espacio intermembrana; la estequiometría tal vez sea de 3 a 4 H⁺ por cada par de electrones transferidos. Se piensa que seis de los polipéptidos que constituyen el complejo I de la mitocondria humana son codificados por genes mitocondriales.

Complejo II (succinato-UQ oxidorreductasa o succinato deshidrogenasa). El complejo II consta de varios polipéptidos, dos de los cuales están compuestos de succinato deshidrogenasa, enzima que contiene FAD enlazada a membrana que cataliza una reacción clave del ciclo del ácido tricarboxílico. Todos son codificados por genes nucleares. El complejo II proporciona una vía para introducir electrones de "baja energía" (próximos a 0 mV) del succinato al FAD o a la ubiquinona. La transferencia de electrones a través del complejo II no se acompaña de translocación de protones.

Complejo III (UQH₂-citocromo *c* oxidorreductasa o citocromo *bc*₁). El complejo III cataliza la transferencia de electrones desde la ubiquinona reducida (UQH₂) al citocromo *c*, que es una proteína periférica de membrana y no parte integral de alguno de los complejos de la cadena respiratoria. Se calcula que cuatro H⁺ se translocan a través de la membrana por cada par de electrones transferidos por medio de la ubiquinona al complejo III. El complejo III contiene casi 10 polipéptidos, uno codificado por el genoma mito-

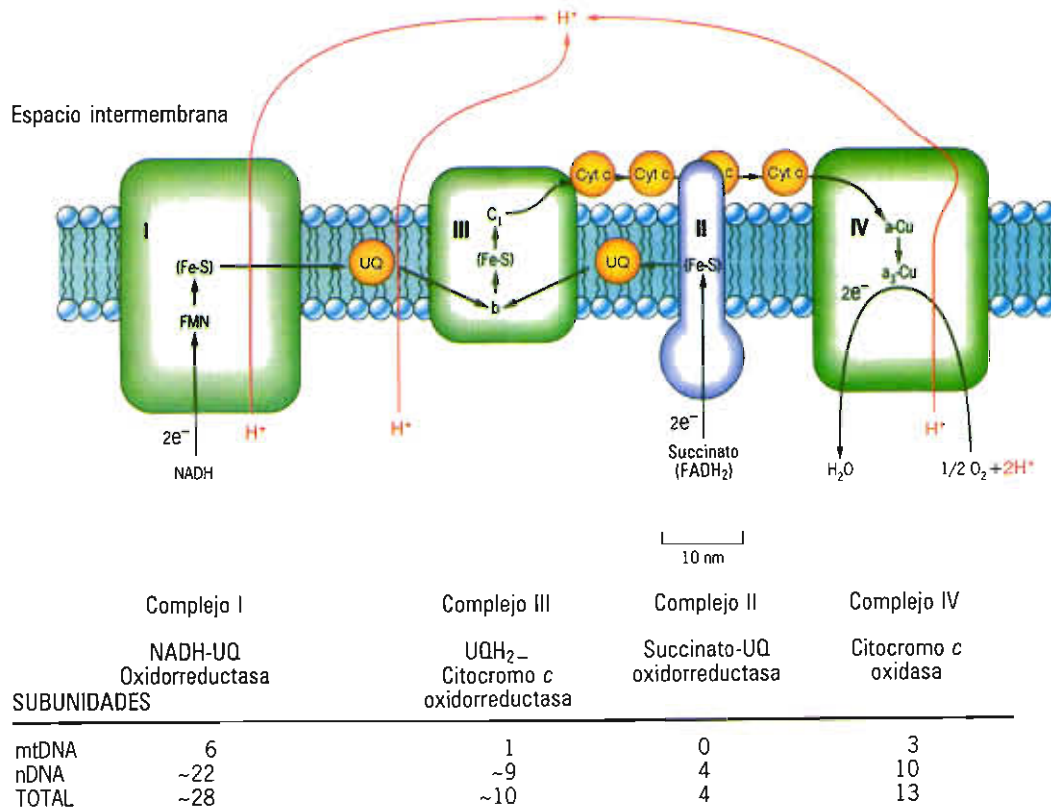


FIGURA 5-17. Esquema de la disposición de los componentes de una cadena transportadora de electrones de la membrana mitocondrial interna. La cadena respiratoria consta de cuatro complejos de portadores de electrones y otros dos portadores (ubiquinona y citocromo *c*) situados de manera independiente. Los electrones ingresan a la cadena procedentes del NADH (vía complejo I) o $FADH_2$ (una parte del complejo II). En seguida pasan de los complejos I o II a la ubiquinona (UQ), un grupo dentro de la bicapa de lípidos. A continuación se transfieren de la ubiquinona al complejo III y luego a la proteína periférica citocromo *c*, la cual se piensa que es móvil; después los electrones pasan del citocromo *c* al complejo IV (citocromo oxidasa) y luego al O_2 para formar H_2O . Se indican los sitios de translocación de protones desde la matriz al citoplasma. El número preciso de protones translocados en cada sitio aún es tema de controversia.

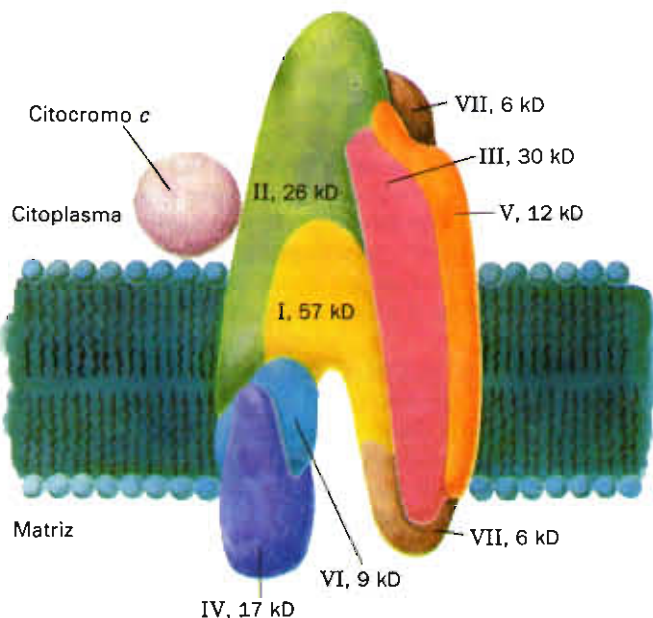
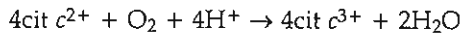


FIGURA 5-18. Citocromo oxidasa. El número preciso de subunidades en una molécula de citocromo oxidasa varía entre las especies, pero en los mamíferos puede ser hasta de 13. Se cree que la proteína existe en la membrana mitocondrial en forma de un dímero. Aquí se muestra la disposición de siete de los polipéptidos de un solo monómero. Se piensa que el monómero contiene dos copias diferentes de la subunidad VII localizadas en diferentes sitios.

condrial, e incluye varios grupos hem y centros de hierro y azufre.

Complejo IV (citocromo c -O₂ oxidorreductasa o citocromo c oxidasa). El paso final del transporte de electrones en la mitocondria es la transferencia de cuatro electrones del citocromo c (cit c) al oxígeno según la reacción



catalizada por el complejo IV, un enorme ensamblamiento de polipéptidos comúnmente denominado *citocromo oxidasa*. Además de reducir el O₂, la citocromo oxidasa también transloca protones a través de la membrana interna.

En la figura 5-18 se muestra un modelo de la molécula de citocromo oxidasa. De los casi 13 polipéptidos que constituyen la enzima del mamífero, tres de ellos, las subunidades I, II y III, son los polipéptidos más grandes del complejo y contienen todos los centros redox. Estas tres subunidades son codificadas en el genoma mitocondrial. La citocromo oxidasa de la cadena respiratoria de la mayor parte de las bacterias aerobias sólo contiene tres subunidades. Como

sería de esperar, si la mitocondria evolucionó a partir de bacterias, las tres subunidades codificadas por el DNA mitocondrial son homólogas de las tres subunidades que constituyen toda la enzima de las células bacterianas.

Se ha estudiado de manera intensiva el mecanismo de transferencia de electrones a través del complejo IV. El principal desafío para los investigadores es explicar de qué manera los portadores que sólo son capaces de transferir electrones simples pueden reducir una molécula de O₂ a dos moléculas de H₂O, proceso que requiere cuatro electrones. Se cree que la reacción ocurre paso a paso, como se muestra en la figura 5-19. Primero se transfieren electrones, uno cada vez, del citocromo c a través de un ion cobre (Cu_A) de la subunidad II al hem (hem a) de la subunidad I (fig. 5-19, *a*). Desde ahí, los electrones pasan, uno cada vez, a un centro redox (binuclear) localizado en la subunidad I que contiene un segundo hem (hem a_3) y a un segundo ion cobre (Cu_B) situado a una distancia menor de 5 Å. Una vez que el centro en a_3 -Cu_B acepta su segundo electrón (paso 3, fig. 5-19, *b*), una molécula de O₂ se une al centro y acepta el par de elec-

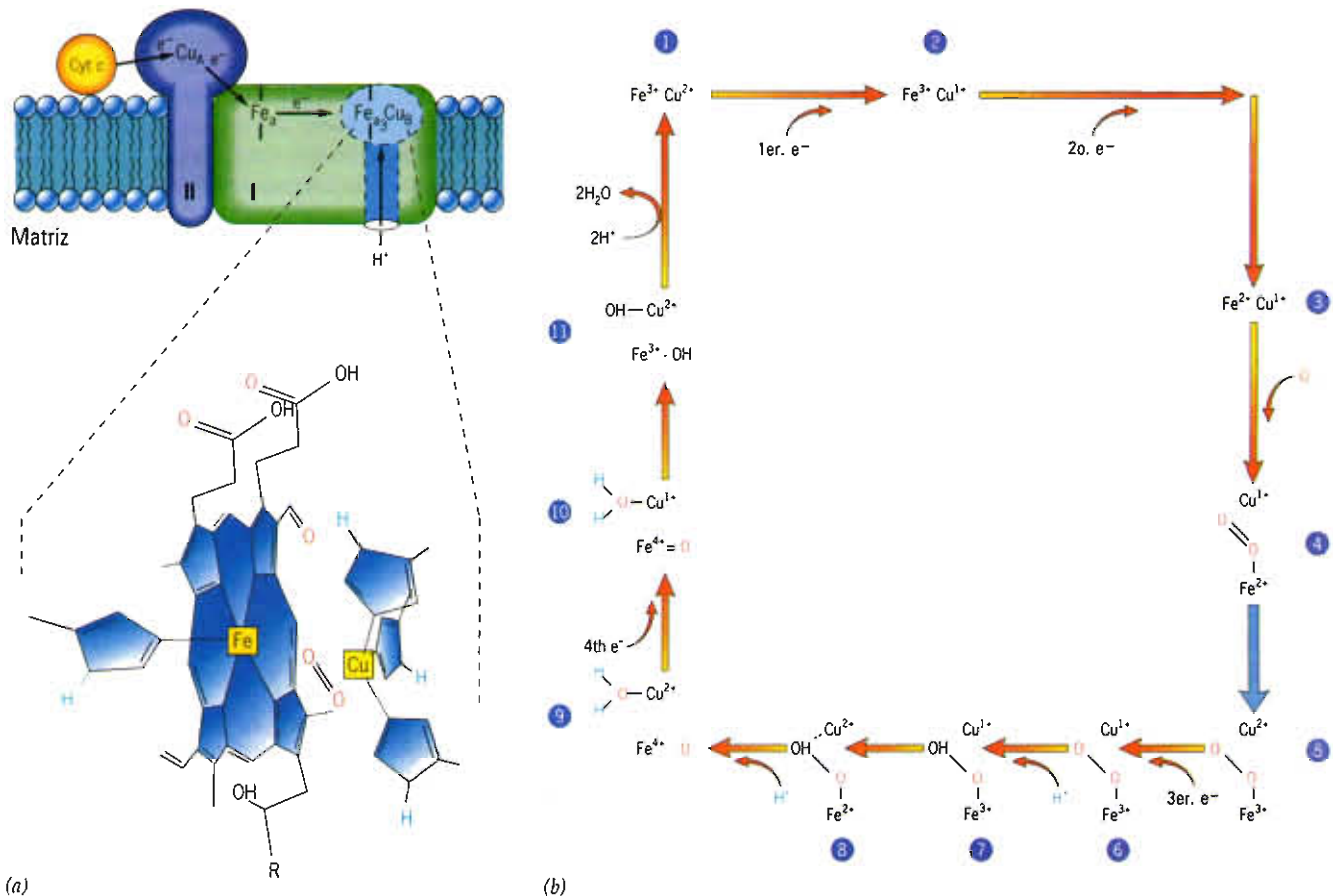


FIGURA 5-19. Mecanismo de acción de la citocromo oxidasa. *a*) Modelo que muestra el flujo de electrones a través de cuatro centros redox de la citocromo oxidasa. Se piensa que los electrones pasan uno cada vez desde el citocromo c al primer ion cobre (Cu_A) y luego al grupo hem (Fe_a) del citocromo a , después al centro redox binuclear que consta de un segundo ion hierro (del grupo hem del citocromo a_3) y un ion cobre (Cu_B). *b*) Mecanismo propuesto para la reducción de O₂ molecular para formar agua en el centro redox binuclear de la citocromo oxidasa, según se describe en el texto. Cuatro electrones en total ingresan al complejo hem a_3 -Cu_B, uno a la vez, desde el grupo hem del citocromo a . También se han propuesto otras vías para el flujo de electrones. (*a*: Según M.W. Calhoun, J.W. Thomas y R.B. Gennis, Trends Biochem. Sci. 19:327, 1994; *b*: según un modelo propuesto por G.T. Babcock y M. Wikström en Nature 356:306, 1992; © 1992 por Macmillan Magazines Ltd.)

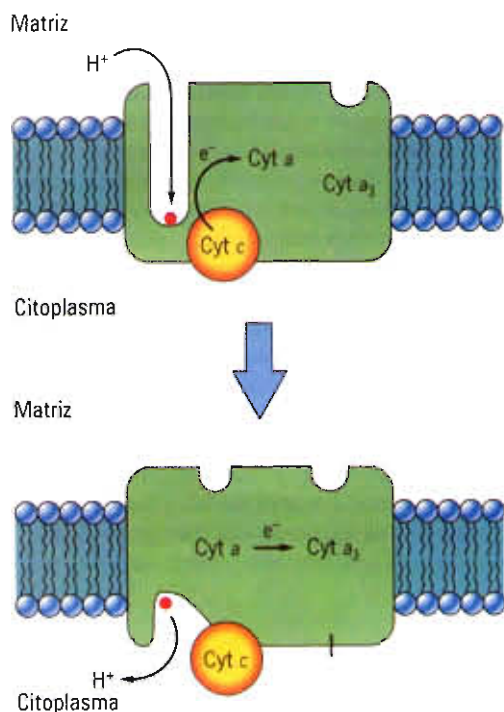


FIGURA 5-20. Esquema de un modelo que muestra cómo puede actuar la citocromo oxidasa como bomba de protones operada por el potencial redox. En la figura 5-19, *a*, se mostró que los electrones pasan del citocromo *c* a través de Cu_A al citocromo *a*. En el modelo que aquí se muestra, la transferencia de un electrón al citocromo *a* se acompaña de un protón que se une a un sitio sobre la enzima. Cuando el electrón se transfiere del citocromo *a* al centro redox binuclear del citocromo $\text{a}_3\text{-Cu}_B$, hay un cambio de conformación que libera el protón en el otro lado de la membrana. Este movimiento de protones ocurre en adición a los protones retirados de la matriz que se emplean para reducir O_2 . (Según *THE VITAL FORCE: A STUDY OF BIOENERGETICS* por F.M. Harold. © 1986 por W.H. Freeman and Company. Reimpreso con autorización.)

trones, formando un peroxianión O_2^{2-} (paso 5, fig. 5-19, *b*). Para impedir su liberación, el ion peróxido reactivo se mantiene en su sitio como un puente entre los componentes con carga positiva a_3 y Cu_B . En el siguiente paso se transfiere un tercer electrón al centro binuclear, que acepta un protón procedente de la matriz y rompe el enlace covalente O-O para reducir uno de los átomos O (paso 7, fig. 5-19, *b*). El paso de un cuarto electrón y la entrada de tres protones adicionales procedentes de la matriz (pasos 8-11, fig. 5-19, *b*) conduce a la formación de dos moléculas de agua. Por cada protón eliminado de la matriz queda detrás un exceso de carga negativa (en forma de un OH^-), y por lo tanto contribuye directamente al gradiente iónico a través de la membrana mitocondrial interna. Algunos venenos respiratorios potentes, incluyendo monóxido de carbono (CO), acido (N_3^-) y cianuro (CN^-), producen su efecto tóxico por enlace al sitio catalítico de la citocromo oxidasa. (El monóxido de carbono también se enlaza al grupo hem de la hemoglobina.)

Además de actuar como agente reductor de O_2 , la citocromo oxidasa es una bomba de protones. La determinación del mecanismo para la translocación de protones por medio de la citocromo oxidasa, y de qué manera la transferencia de electrones realiza este proceso, todavía esperan

un análisis estructural de alta resolución de todo el complejo. De alguna manera, el paso de electrones a través de las partes del complejo citocromo oxidasa induce cambios de conformación como el ilustrado en la figura 5-20, que causa que los protones se desplacen desde la matriz al interior del espacio intermembrana.

La transferencia de electrones del citocromo *c* al O_2 ocurre por un gran descenso del potencial redox (cuando menos 300 mV). Un descenso de cuatro electrones en este potencial puede explicar la translocación de hasta seis H^+ a través de la membrana, además de los cuatro protones derivados de la matriz que se consumen en la conversión de O_2 a agua. La verdadera proporción tal vez se aproxime más a los cuatro H^+ bombeados por molécula de O_2 reducida, pero aún es un tema de considerable debate.²

5-4 Translocación de protones y establecimiento de una fuerza motriz de protones

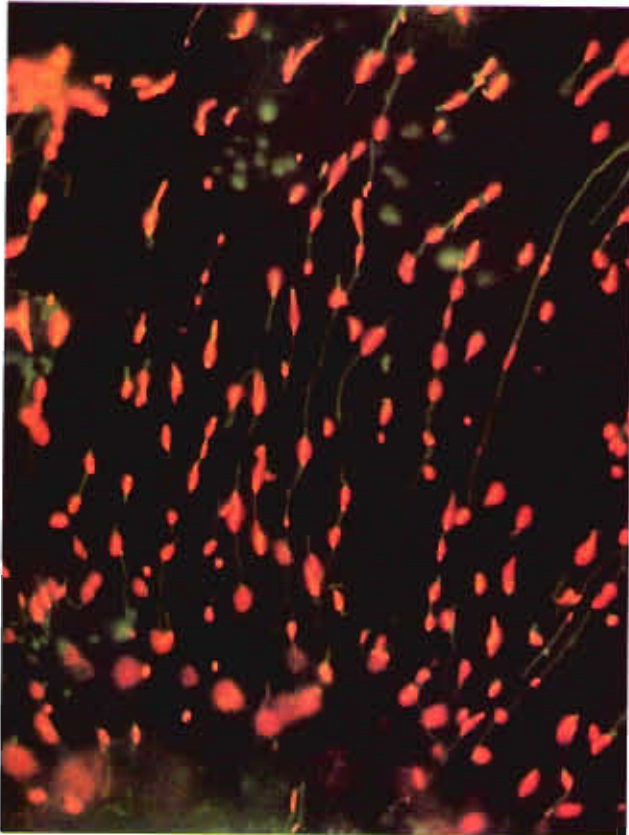
Ya hemos visto que la energía libre liberada en forma de electrones pasa de NADH o de FADH_2 al oxígeno molecular y se emplea para desplazar protones de la matriz al espacio intermembrana. La translocación de protones a través de la membrana interna es electrógena (o sea, produce voltaje), debido a que proviene de un mayor número de cargas positivas en el espacio intermembrana y el citoplasma, y un mayor número de cargas negativas dentro de la matriz. Por lo tanto, se deben considerar dos componentes en el gradiente de protones. Uno es la diferencia de concentración entre los iones hidrógeno a un lado de la membrana en comparación con el otro lado; éste es un gradiente de pH (ΔpH). El otro componente es el voltaje (ψ) que resulta de la separación de cargas a través de la membrana. Un gradiente con un componente de concentración (químico) y un componente eléctrico (voltaje) es un *gradiente electroquímico* (pág. 190). La energía presente en ambos componentes del gradiente electroquímico de protones se puede combinar y expresar como **fuerza motriz de protones (Δp)**, que se mide en milivoltios. Por lo tanto,

$$\Delta p = \psi - 2.3 RT/F \Delta\text{pH}$$

Ya que $2.3 RT/F$ es igual a 59 mV a 25°C, la ecuación³ se puede replantear como

² Con el tiempo se dio gran importancia al número particular de protones translocados por electrón transferido por molécula de oxígeno reducida a agua por molécula de ATP sintetizada. Estas diferentes proporciones son importantes para determinar el mecanismo preciso de síntesis de ATP, pero aún hay gran desacuerdo respecto de las verdaderas cifras. Para no añadir complejidad innecesaria a un tema de por sí complicado, tratamos de evitar el análisis de las diferentes proporciones. Las estimaciones actuales sugieren que se translocan casi 10 protones por cada par de electrones que viajan desde el NADH al O_2 y se utilizan tres protones en la síntesis de una molécula de ATP por la ATP sintasa.

³ En otras palabras, una diferencia de pH de una unidad representa una diferencia 10 veces mayor o menor en la concentración de H^+ a través de la membrana y equivale a una diferencia de potencial de 59 milivoltios, que es igual a una diferencia de energía libre de 1.37 kcal/mol.



7 µm

FIGURA 5-21. Visualización de la fuerza motriz de protones. Micrografía por fluorescencia de una célula cultivada y teñida con el compuesto catiónico fluorescente JC-1. Cuando la célula está activa, el voltaje generado a través de la membrana mitocondrial interna (interior negativo) produce acumulación de la sustancia liposoluble dentro de la mitocondria y provoca fluorescencia de los organelos. Con potenciales de membrana altos, JC-1 forma agregados que cambian sus propiedades de fluorescencia. En el estado monomérico, el colorante muestra fluorescencia verde, en tanto que en el estado agregado muestra fluorescencia de color rojo. Se observa que la célula contiene organelos fluorescentes de color naranja y de color verde, lo que sugiere la presencia de dos poblaciones diferentes de mitocondrias con distintos potenciales de membrana. (Cortesía de Lan Bo Chen.)

$$\Delta p = \psi - 59 \Delta \text{pH}$$

donde ΔpH se expresa con valor negativo en tanto $[\text{H}^+]$ sea mayor en el espacio intermembrana que en la matriz.

La contribución del potencial eléctrico a la fuerza motriz de protones en comparación con el gradiente de pH depende de las propiedades de permeabilidad de la membrana interna. Por ejemplo, si durante el transporte de electrones el movimiento de protones hacia fuera se acompaña de iones cloro con carga negativa, entonces el potencial eléctrico (ψ) se reduce sin afectar el gradiente de protones (ΔpH). Mediciones efectuadas en diferentes laboratorios (pág. 200) sugieren que una mitocondria que respira activamente genera una fuerza motriz de protones de unos 220 mV a través de su membrana interna. Se estima que en la mitocondria de mamíferos cerca de 80% de la energía libre

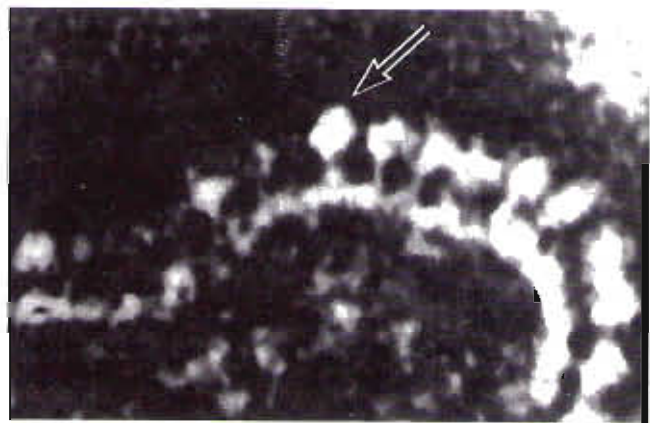
del Δp está representada por el componente de voltaje y el otro 20% por la diferencia de concentración de protones (cerca de 0.5 cuando la diferencia de pH es de una unidad). Si la fuerza motriz de protones fuera principalmente el gradiente H^+ , todo el citoplasma sería muy ácido, propiedad que puede afectar la actividad de las enzimas citoplásmicas. La presencia de voltaje transmembrana se puede demostrar visualmente utilizando colorantes liposolubles con carga positiva que se distribuyen a través de la membrana en proporción al potencial eléctrico (fig. 5-21).

Hace varios decenios se descubrió que ciertos agentes, sobre todo 2,4-dinitrofenol (DNF), eran capaces de desacoplar el proceso de oxidación de la mucosa y la desfosforilación del ATP. Cuando se trata a células con DNF siguen oxidando sustratos pero ya no generan ATP. El fármaco actúa como desacoplador de la fosforilación oxidativa porque vuelve permeable la membrana mitocondrial a protones. Para mantener una fuerza motriz de protones, la membrana mitocondrial interna debe ser muy impermeable a protones. En caso contrario, el gradiente establecido por el transporte de electrones se disipa de inmediato por la difusión de protones de regreso al interior de la matriz.

Los experimentos que condujeron a aceptar la fuerza motriz de protones como intermediario en la formación de ATP se analizan en *La vía experimental*, al final del capítulo.

5-5 Mecanismo para la formación de ATP

Ya vimos cómo el transporte de electrones genera un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna; ahora podemos regresar al mecanismo molecular que utiliza la energía almacenada en este gradiente para la fosforilación de ADP.



10 nm

FIGURA 5-22. Mecanismo de la síntesis de ATP. Micrografía electrónica de una pequeña porción de la mitocondria del corazón de ternera secada al aire y teñida en negativo. Con una amplificación aproximada de medio millón, se observan partículas esféricas unidas por un pequeño tallo a la superficie de las crestas de la membrana interna. (Según Humberto Fernandez-Moran y cols. J. Cell Biol. 22:71, 1974, con permiso de Rockefeller University Press.)

A principios del decenio de 1970, Humberto Fernández-Morán, del Hospital General de Massachussetts, estaba examinando mitocondrias aisladas por medio de la técnica recién desarrollada de tinción negativa, y descubrió una capa de esferas unidas al lado interno (lado de la matriz) de la membrana interna que se proyectaban desde la membrana y se unían a la misma por medio de tallos (fig. 5-22). Pocos años después, Efraim Racker, de la Universidad Cornell, aisló las esferas de la membrana externa, a las cuales llamó **factor 1 de acoplamiento**, o simplemente F_1 . Racker descubrió que las esferas F_1 se comportaban como una enzima que hidroliza ATP, o sea una ATPasa. A primera vista este parece ser un hallazgo muy peculiar. ¿Por qué la mitocondria debe poseer una enzima para hidrolizar a la sustancia que se supone produce? Cuando se considera que la hidrólisis del ATP es la reacción inversa de su síntesis, puede ser más evidente la función de la esfera F_1 ; ésta contiene el sitio catalítico en el cual ocurre normalmente la formación de ATP. Recordemos que

1. Las enzimas no afectan la constante de equilibrio de la reacción que catalizan.
2. Las enzimas pueden catalizar las reacciones en ambas direcciones.

Por consiguiente, la dirección de una reacción catalizada por enzimas depende en todo momento de las condiciones prevalecientes. Esto se demostró elegantemente en experimentos con otras ATPasas, como la ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ de la membrana plasmática (pág. 149). Cuando se estudió esta enzima en el capítulo 4, se describió como una enzima que aprovecha la energía obtenida en la hidrólisis del ATP para exportar Na^+ e importar K^+ contra sus respectivos gradientes. Esta es la única función de la enzima en la célula. Sin embargo, en condiciones experimentales esta enzima puede catalizar la formación de ATP en vez de su hidrólisis (fig. 5-23). Para lograr dichas condiciones se prepararon fantasmas de eritrocitos (pág. 139) con concentración interna de K^+ y concentración externa de Na^+ muy elevadas, más altas de las que normalmente existen en la célula. En estas condiciones, el K^+ sale de la "célula" y el Na^+ entra a la misma. Ambos iones se mueven siguiendo sus respectivos gradientes y no en contra de los mismos, como ocurre normalmente en una célula viviente. Si dentro del fantasma hay ADP y P_i , el movimiento de los iones produce síntesis de ATP en vez de hidrólisis. Experimentos como éste ilustran lo que sería de esperar con base en la reversibilidad teórica de las reacciones catalizadas por enzimas. También ilustran cómo se puede utilizar un gradiente iónico para efectuar una reacción en la cual se fosforila ADP para formar ATP, que es precisamente lo que ocurre en la mitocondria. La fuerza empleada es la fuerza motriz de protones establecida por el transporte de electrones.

Estructura de la ATP sintasa

La esfera F_1 es la porción catalítica de la enzima que sintetiza ATP en la mitocondria, pero ésta no es la historia completa. La enzima sintetizadora de ATP (fig. 5-24), denominada

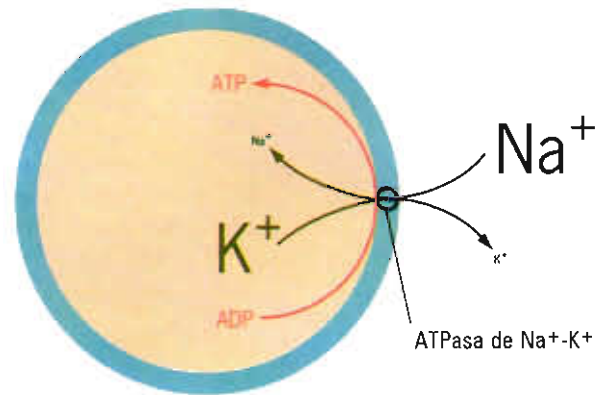


FIGURA 5-23. Experimento para efectuar la síntesis de ATP en vesículas de membrana reconstituidas con ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$. Al ocasionar en estas vesículas una concentración interna muy elevada de K^+ y una concentración externa muy elevada de Na^+ , la reacción tiene lugar en dirección opuesta a la que sigue en su curso normal dentro de la membrana plasmática. En este proceso se forma ATP a partir de ADP y P_i . El tamaño de las letras indica la dirección de los gradientes de concentración.

ATP-sintasa (o *complejo V*), se compone de dos elementos principales: la pieza cabeza F_1 y una sección basal, llamada F_0 , integrada a la membrana interna. Las dos porciones están conectadas por un estrecho tallo. Se estima que una mitocondria típica de hígado de mamífero posee regularmente 15 000 copias de ATP-sintasa. En la membrana plasmática de bacterias aerobias, la membrana tilacoides de células vegetales y la membrana interna de las mitocondrias se observan versiones homólogas de la ATP-sintasa. Puesto que la ATP-sintasa de la bacteria *E. coli* es la mejor caracterizada, emplearemos esta versión particular como centro del siguiente análisis.

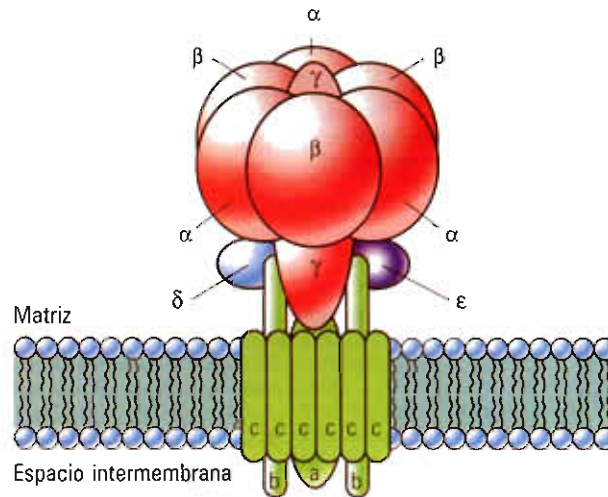
La pieza cabeza F_1 tiene un peso molecular de casi 360 000 daltons y contiene cinco polipéptidos diferentes (fig. 5-24). En la enzima mitocondrial, los polipéptidos homólogos son codificados por el DNA nuclear, sintetizados en el citoplasma e importados después de la traducción. La porción F_0 de la ATP-sintasa bacteriana consta de tres polipéptidos diferentes y se cree que uno de ellos (el polipéptido b) se proyecta afuera de la membrana para formar el tallo. En células de mamífero, los homólogos mitocondriales de estos tres polipéptidos son codificados por DNA mitocondrial, en tanto que varios polipéptidos adicionales no presentes en la enzima bacteriana son codificados por DNA nuclear. En las mitocondrias, la pieza basal F_0 está integrada a la membrana mitocondrial interna y forma un canal a través del cual se conducen protones desde el espacio intermembrana al interior de la pieza cabeza F_1 .

La presencia de un canal en la pieza basal F_0 puede apreciarse mejor en experimentos donde la membrana mitocondrial interna se fragmenta y forma vesículas membranosas llamadas *partículas submitocondriales* (fig. 5-25). Las partículas submitocondriales intactas pueden oxidar sustratos, generar un gradiente de protones y sintetizar ATP. Sin embargo, si se eliminan las esferas F_1 de las partículas mediante



(a)

FIGURA 5-24. Estructura de la ATP sintasa. a) Micrografía electrónica de la enzima aislada. b) Esquema de la ATP sintasa. La enzima consta de dos porciones principales: la pieza cabeza F_1 , que consta de cinco subunidades diferentes en proporción $3\alpha:3\beta:1\delta:1\gamma:1\epsilon$ y la pieza basal F_0 , la cual se integra a la membrana y consta de tres subunidades diferentes en la relación $1a:2b:12c$. Las subunidades b de F_0 se extienden hacia adentro de la pieza cefálica para formar un tallo. (a: Según J.W. Soper, G.L. Decker y P.L. Pederson, J. Biol. Chem. 254:11173, 1979.)



(b)

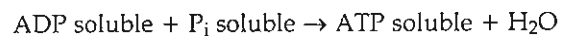
tratamiento con urea, la membrana de la vesícula ya no puede mantener un gradiente de protones a pesar de que continúa oxidando sustrato y transportando electrones. Los protones translocados a través de la membrana simplemente retornan a través de la ATP-sintasa "decapitada" y la energía se disipa.

Mecanismo de la formación de ATP

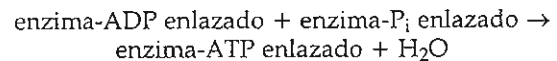
En la actualidad hay acuerdo prácticamente unánime acerca de que el movimiento de electrones a lo largo de la cadena respiratoria produce un gradiente de protones, y que el movimiento de protones que cruzan de regreso la membrana a través de la ATP-sintasa actúa para conducir a la formación de ATP. El mecanismo para que esto ocurra es menos claro. Una hipótesis formulada por Paul Boyer y sus colegas, de la UCLA, continúa ganando aceptación. En la hipótesis de Boyer, el movimiento de protones a favor de un gradiente electroquímico a través de los canales en la base F_0 y en la cabeza F_1 induce cambios de conformación que alteran la afinidad de la proteína para ADP, P_i y ATP. Consideremos con mayor atención esta hipótesis.

De ordinario se piensa en reacciones celulares que ocurren en un medio acuoso en el cual la concentración de agua es 55 M, y los reactantes y productos simplemente están disueltos en el medio. En estas condiciones se requiere energía para formar enlaces covalentes que unan el ADP con fosfato inorgánico para formar ATP. Sin embargo, se ha demostrado que una vez que ADP y P_i se unen firmemente en el sitio catalítico de la ATP-sintasa, los dos reactantes

enlazados se condensan con facilidad para formar una molécula de ATP enlazada sin ingreso de energía adicional. En otras palabras, aunque la reacción



puede requerir el ingreso de una cantidad considerable de energía (7.3 kcal/mol en condiciones estándar), la reacción



posee una constante de equilibrio cercana a 1 ($\Delta G^\circ = 0$), y por lo tanto puede ocurrir espontáneamente sin el ingreso de energía (pág. 83). Esto no significa que se pueda sintetizar ATP a partir de ADP sin consumir energía; más bien indica que la energía se requiere para enlazar los sustratos al sitio activo, para liberar el producto del sitio activo o para ambos procesos, y no para la fosforilación en sí. Se cree que este proceso ocurre de la siguiente manera.

Según la hipótesis de Boyer de "cambio de enlace", cada pieza cabeza F_1 contiene tres sitios catalíticos (uno por cada subunidad β) que varían progresivamente a través de tres diferentes conformaciones, según se refleja en su afinidad por nucleótidos. Estas tres conformaciones pueden describirse como la conformación "apretada" o T, en la cual los nucleótidos ($ADP + P_i$ o ATP) están firmemente unidos; la conformación "laxa" o L, en la cual ADP y P_i están laxamente unidos; y la conformación "abierta" u O, la cual debido a su muy escasa afinidad por nucleótidos se considera que está vacía. Estos tres sitios se ilustran en el diagrama de la figura 5-26. Los pasos descritos en seguida se refieren a hechos que ocurren en el sitio catalítico, coloreado en rojo en esa figura.

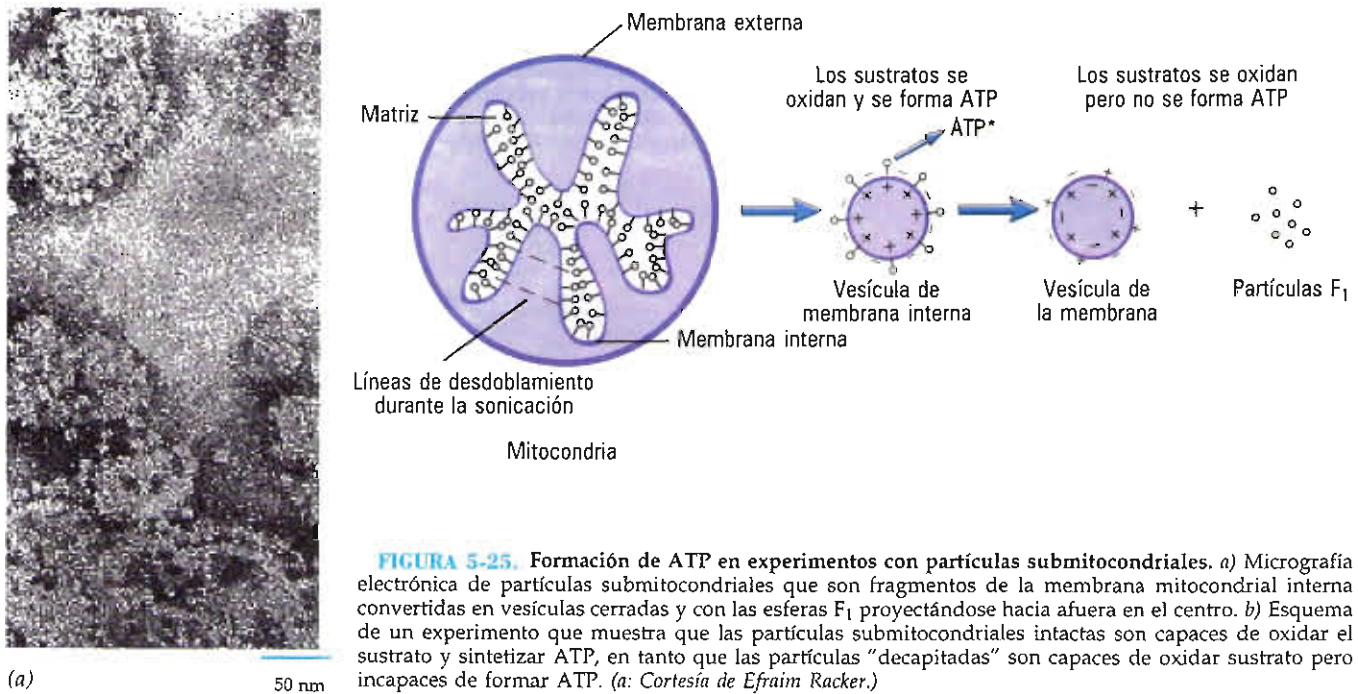


FIGURA 5-25. Formación de ATP en experimentos con partículas submitocondriales. *a)* Micrografía electrónica de partículas submitocondriales que son fragmentos de la membrana mitocondrial interna convertidas en vesículas cerradas y con las esferas F₁ proyectándose hacia afuera en el centro. *b)* Esquema de un experimento que muestra que las partículas submitocondriales intactas son capaces de oxidar el sustrato y sintetizar ATP, en tanto que las partículas “decapitadas” son capaces de oxidar sustrato pero incapaces de formar ATP. (*a:* Cortesía de Efraim Racker.)

En el paso 1 de la figura 5-26, ADP y P_i se enlazan laxamente al sitio catalítico en la conformación L. A continuación los protones se enlazan a la enzima en los sitios alostéricos que enfrentan el espacio intermembrana donde la concentración de H⁺ es alta. Una vez enlazados, los protones inducen cambios de conformación que aumentan la afinidad del sitio catalítico para ADP y P_i, provocando que estos reactantes se unan con mucho mayor firmeza a la enzima (esto se indica con los sustratos unidos a la conformación T en el paso 2 de la figura 5-26). A continuación los reactantes se condensan en forma espontánea para formar ATP, que permanece fuertemente enlazado al sitio activo en la conformación T (paso 3, fig. 5-26). En seguida, la enzima

sufre un cambio de conformación que expone el sitio alostérico de enlace a protones al lado de la membrana correspondiente a la matriz, donde la concentración de H⁺ es baja. La disociación de los protones de la enzima en la matriz cambia la conformación del sitio catalítico, disminuye su afinidad por el ATP enlazado y se libera el producto dentro de la matriz (paso 4, fig. 5-26). La reacción total neta llevaría a la síntesis de ATP a expensas de los protones que se mueven siguiendo su gradiente desde el espacio intermembrana hacia la matriz.

Se cree que los cambios de conformación del sitio activo se acompañan de la rotación de la pieza cabeza F₁ en relación con su tallo, llevando los sitios catalíticos a posi-

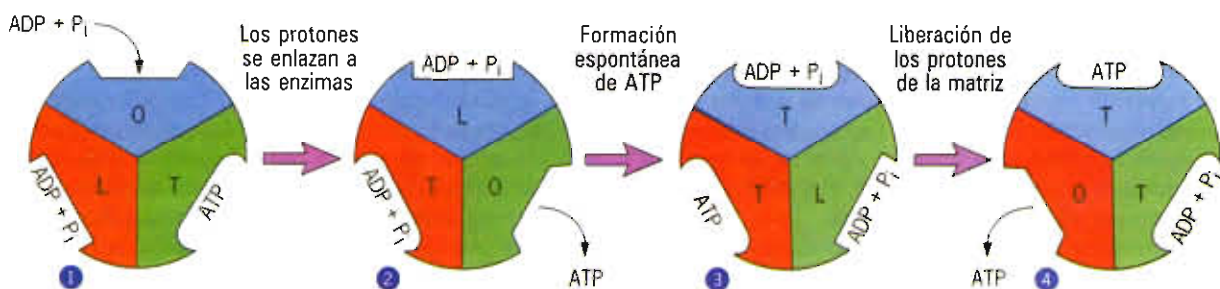


FIGURA 5-26. Hipótesis de “cambio de enlace” como mecanismo por el cual el gradiente de protones efectúa la síntesis de ATP. Los pasos numerados se refieren a la secuencia de acontecimientos que ocurren en la subunidad de color rojo, según se describe en el texto. Lo más importante es que el enlace de protones a la enzima en el lado citoplásmico de la membrana provoca un cambio de conformación (desde el paso 1 hasta el 2), que da como resultado el enlace firme de ADP y de P_i en el sitio catalítico de la enzima. A continuación, la formación de ATP ocurre de manera espontánea. La liberación subsecuente de protones al interior de la matriz causa un segundo cambio de conformación (pasos 3 a 4) que libera el ATP recién formado.

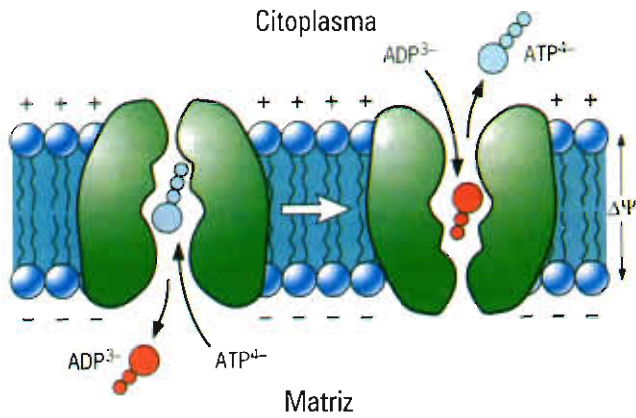


FIGURA 5-27. Empleo de la fuerza motriz de protones para desplazar ADP al interior de la matriz y ATP al espacio intermembrana (y por lo tanto citoplásmico).

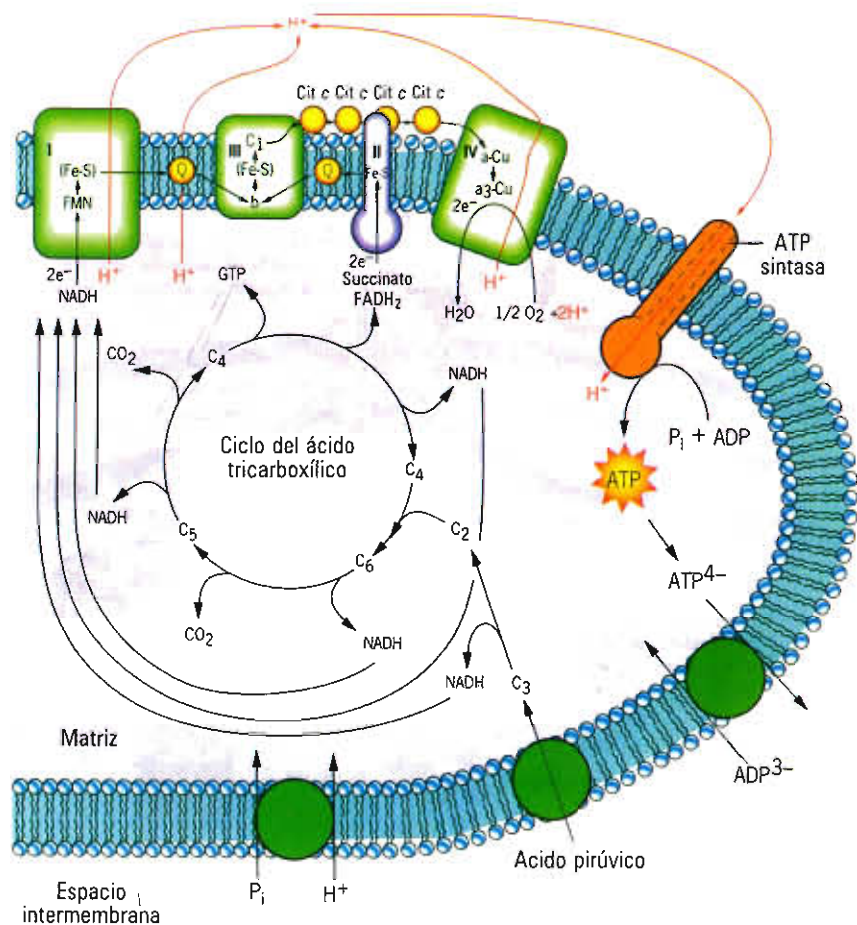
ciones sucesivas para interactuar con los protones que vienen a través del canal F_0 . Un trabajo publicado en 1994 acerca de la estructura atómica de la porción mayor de la pieza cabeza F_1 de las mitocondrias del corazón de ternera su-

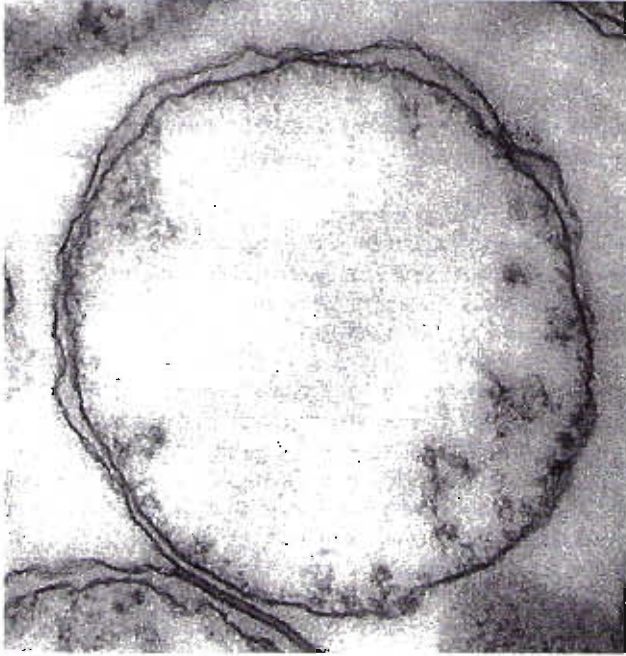
ministró fuerte apoyo a la hipótesis de cambio de enlace así como a la proposición de que la pieza cabeza gira sobre su tallo.

Otras funciones para la fuerza motriz de protones además de la síntesis de ATP

Aunque la actividad más importante de las mitocondrias puede ser la producción de ATP, estos organelos participan en muchas otras actividades que requieren ingreso de energía. A diferencia de la mayor parte de los organelos que dependen principalmente de la hidrólisis de ATP para obtener la energía necesaria en sus actividades, las mitocondrias dependen de una reserva alterna de energía: la fuerza motriz de los protones. Por ejemplo, una investigación de los transportadores situados entre la membrana mitocondrial interna revela varios ejemplos en los cuales el movimiento de solutos es gobernado por la energía libre almacenada en el gradiente iónico a través de esta membrana "energizada". Un punto de discusión es la *ADP-ATP translocasa* que transporta ADP al interior de la matriz, donde sirve como reactante para la síntesis de ATP, intercambiándolo por ATP, el cual se desplaza hacia afuera de las mitocondrias. Las moléculas de ATP llevan una carga negativa extra en comparación con sus contrapartes ADP (ATP^{4-} en comparación con

FIGURA 5-28. Resumen de las principales actividades que ocurren durante la respiración aerobia en una mitocondria.

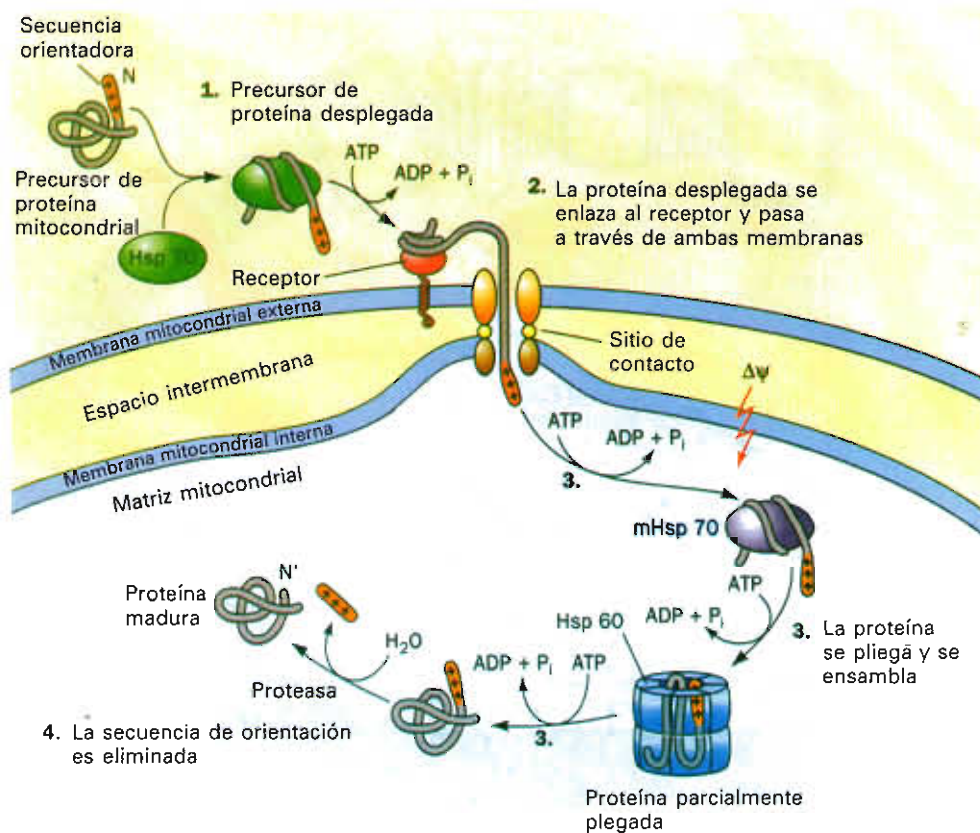




(a)

0.2 μm

FIGURA 5.29 Importación de proteínas al interior de una mitocondria. a) Micrografía electrónica de una mitocondria que importa proteínas precursoras mitocondriales *in vitro*. Los sitios por donde penetran las proteínas se revelan marcando las proteínas con partículas de oro visibles al microscopio electrónico. Las partículas se localizan en sitios donde las membranas interna y externa están en contacto. b) Pasos propuestos seguidos por una proteína importada al interior de la matriz mitocondrial. El polipéptido se dirige a la mitocondria gracias a la secuencia orientadora en el N-terminal, que finalmente es eliminada en la matriz. Hsp70 y mHsp70 son chaperones moleculares. El Hsp70 citoplásmico facilita el desplegamiento del polipéptido antes de penetrar a la mitocondria, en tanto que el mHsp70 mantiene la proteína importada en un estado de plegamiento laxo dentro de la matriz antes de transferirla al chaperón Hsp60 donde ocurre el plegamiento. Hsp60 es una cámara de doble capa cuya estructura y función son similares al GroEL bacteriano descrito en la página 74. (a: Según Martin Schwaiger, Volker Herzog y Walter Neupert, J. Cell Biol. 105:243, 1987; con permiso de Rockefeller University Press.)



(b)

ADP³⁻). Debido a esta carga negativa adicional, se cree que el potencial eléctrico a través de la membrana interna (lado exterior positivo) (fig. 5-27) “tira” de las moléculas de ATP hacia afuera de la matriz. Un transportador separado de la membrana interna capta el fosfato junto con un protón y suministra la energía para la reacción. Así pues, la fuerza motriz de protones no sólo se emplea para la formación de ATP, sino también para exportar el producto nucleótido fuera de la mitocondria e importar los reactantes al interior de la matriz. Estas diferentes actividades se resumen en la figura 5-28; la mayor parte de ellas se relacionan de manera directa o indirecta con la síntesis de ATP.

En otros ejemplos, la fuerza motriz de protones se puede utilizar como fuente de energía para “tirar” de los iones calcio hacia el interior de la mitocondria; para iniciar la reacción transhidrogenasa que produce NADPH, que constituye el poder reductor de la célula (pág. 104); y para obligar a polipéptidos específicos a penetrar a la mitocondria procedentes de la matriz (esto se analiza posteriormente).

5-6 Importación de las proteínas mitocondriales

Muchas de las proteínas de la mitocondria se distinguen por estar ensambladas a partir de polipéptidos sintetizados en regiones totalmente diferentes de la célula, característica que confiere especial interés al estudio de la biogénesis mitocondrial. Los polipéptidos codificados por el genoma mitocondrial y sintetizados en la matriz de la mitocondria son introducidos a la membrana mitocondrial interna como parte de proteínas integrales de la membrana (fig. 5-17). Los restantes polipéptidos de la mitocondria son codificados por el genoma nuclear y sintetizados en el citoplasma. ¿Cómo puede este último grupo de polipéptidos encontrar su camino dentro de las diferentes partes de la mitocondria? La vía mejor estudiada conduce del citoplasma a la matriz, el compartimiento mitocondrial más interno.

Los polipéptidos importados a la matriz contienen un segmento de 20 a 70 aminoácidos adicionales a su N-terminal que dirige la molécula hacia la matriz. Esta secuencia orientadora contiene algunos aminoácidos hidroxilados con carga positiva que son la señal reconocida y enlazada por un complejo receptor en la superficie externa mitocondrial. La translocación del polipéptido desde el citoplasma al interior de la matriz mitocondrial ocurre en sitios donde las membranas mitocondriales externa e interna forman contactos especializados (fig. 5-29, a). El movimiento a través de la membrana interna es gobernado por el potencial eléctrico a través de la membrana que actúa sobre la secuencia orientadora con carga positiva; cuando se disipa el potencial añadiendo un desacoplador, la translocación se interrumpe y el polipéptido permanece “atrapado” dentro de la membrana.

La evidencia indica que aunque una proteína mitocondrial puede sufrir plegamiento en el citoplasma, se desdobra como resultado de su asociación a un chaperón citoplásmico denominado Hsp70 (fig. 5-29, b). (El papel de los chaperones se analiza en la página 71.) La proteína desdoblada es liberada al receptor mitocondrial y entonces pasa a través de un poro situado en la membrana mitocondrial en

su estado extendido, desplegado. Una vez dentro de la matriz, el segmento orientador N-terminal es eliminado por una proteasa y el polipéptido interactúa con nuevos chaperones moleculares (fig. 5-29, b) que facilitan el plegamiento y ensamblado final.

La ruta que siguen las proteínas destinadas a la membrana interna y al espacio intermembrana está menos bien definida. Algunos polipéptidos aparentemente penetran a la matriz por la vía ya mencionada y luego son exportados de la matriz hacia la membrana interna o la atraviesan por completo hacia el interior del espacio intermembrana. Otras pueden pasar del citoplasma, a través de la membrana externa, y dirigirse a su destino final. Como se hizo notar antes, varias proteínas de la membrana interna deben ensamblarse a partir de polipéptidos sintetizados en la mitocondria y el citoplasma. Los polipéptidos sintetizados en la matriz mitocondrial tal vez sean elaborados por un mecanismo similar al que opera en el retículo endoplásmico rugoso (pág. 287). Los ribosomas mitocondriales se unen a la superficie interna de la membrana interna y el polipéptido nascente se transloca al interior de la membrana conforme se sintetiza (o sea, cotranslación).

5-7 Peroxisomas

En 1954, el examen con microscopio electrónico de las células de los túbulos renales reveló una partícula con apariencia granular densa de 0.5 a 1.0 μm de diámetro, aproximadamente, enlazada a la membrana. Nada se sabía acerca de la función de esta estructura y se le denominó *microcorpúsculo*. Posteriormente se encontraron organelos similares en varias células eucariotas. Conforme se conoció más acerca de su función se le dividió en dos tipos principales: **peroxisomas**, presentes tanto en plantas como en animales, y **glioxisomas**, que sólo se observan en las plantas. Los microcorpúsculos se consideran en el presente capítulo debido a que comparten dos propiedades con las mitocondrias: participan en el metabolismo oxidativo e importan sus proteínas después de ser traducidas.

Los peroxisomas son vesículas simples rodeadas por una membrana (fig. 5-30, a) y con frecuencia contienen un núcleo cristalino denso consistente en una enzima oxidativa (fig. 6-25). Los peroxisomas son “fábricas” metabólicas muy versátiles, con enzimas que participan en actividades tan diversas como oxidación de ácidos grasos de cadena muy larga (AGCML, una de cuyas cadenas contiene más de 18 carbonos); síntesis hepática de colesterol y ácidos biliares; y síntesis de plasmalógenos, un tipo importante de fosfolípidos del tejido cerebral, en los cuales un ácido graso se une al glicerol mediante una unión éter en vez de una unión éster. La enzima luciferasa, que genera la luz emitida por las luciérnagas, también es una enzima peroxisómica.

Estos organelos se denominaron “peroxisomas” debido a que se encuentran en los sitios donde se forma peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un agente oxidante tóxico y muy reactivo. El peróxido de hidrógeno se sintetiza por acción de varias enzimas, incluyendo urato oxidasa, glucolato oxidasa y aminoácido oxidasas, que utilizan el oxígeno molecular para

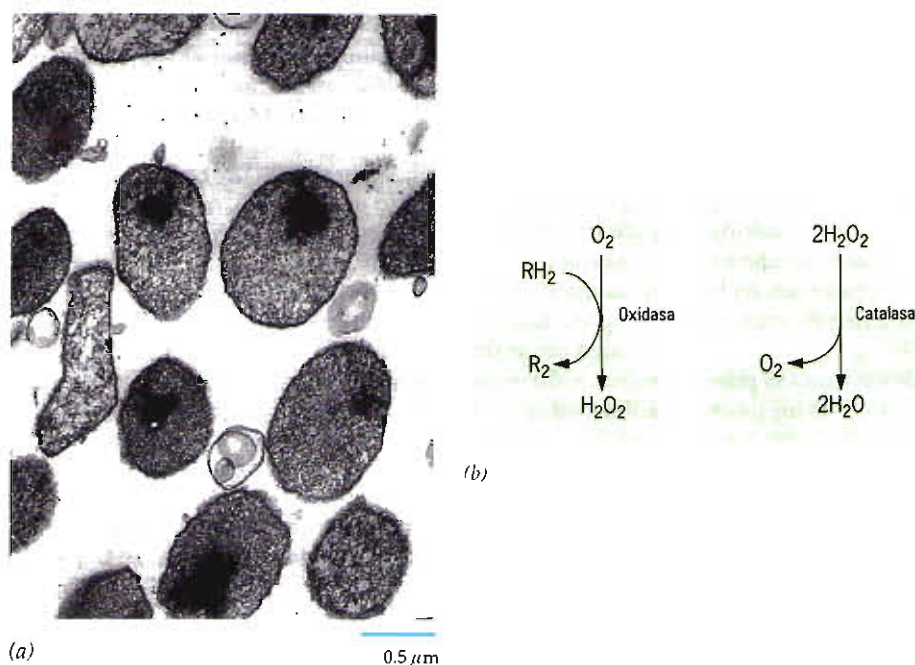


FIGURA 5-30. Estructura y función de los peroxisomas. *a)* Micrografía electrónica de peroxisomas purificados, aislados por centrifugación a través de un gradiente de densidad de sacarosa. *b)* Los peroxisomas contienen enzimas que efectúan la reducción del oxígeno molecular en dos pasos para formar agua. En el primer paso, una oxidasa elimina electrones de varios sustratos (RH_2), como ácido úrico o aminoácidos. En el segundo paso, la enzima catalasa convierte en agua el peróxido de hidrógeno formado en el primer paso. (*a:* Según Y. Fujiki y cols., J. Cell Biol. 93:105, 1982; con permiso de Rockefeller University Press.)

LA VIA EXPERIMENTAL

Acoplamiento de oxidación a fosforilación

El vínculo entre oxidación y fosforilación fue propuesto por primera vez por el bioquímico ruso Vladimir Engelhardt, en 1932, quien observó que las células colocadas en condiciones anaerobias rápidamente agotan sus reservas de ATP. Cuando se restablecen las condiciones aerobias, el ATP se resintetiza con rapidez.¹ El acoplamiento de dos procesos biológicos básicos; la oxidación de sustratos y la fosforilación de ADP, se convirtió en una de las áreas más importantes y debatidas de la investigación en biología celular. Una de las preguntas básicas que debe responderse es de qué manera se almacena la energía liberada a lo largo de la cadena respiratoria como consecuencia del movimiento de electrones, de modo que pueda aprovecharse para la síntesis de ATP.

La primera hipótesis importante para explicar el acoplamiento de fosforilación a oxidación se basó en la experiencia obtenida de investigaciones acerca de reacciones acopladas a energía. En 1953, E.C. Slater propuso que la energía liberada por el transporte de electrones queda atrapada en un intermediario químico de alta energía, el cual subsecuentemente se emplea en una reacción para formar ATP.² En la figura 3-27 se hizo notar que numerosos compuestos biológicos tienen potencial elevado para transferir fosfatos en comparación con ATP. Cualquier compuesto de este tipo puede servir para almacenar energía que subsecuentemente se utilice en la síntesis de ATP transfiriendo un fosfato al ADP. Esta es la esencia de la fosforilación a nivel sustrato (pág. 102). La búsqueda del

intermediario químico de alta energía en la fosforilación oxidativa ocupó la actividad de un gran número de laboratorios cuando menos durante 10 años, pero no se descubrió dicho compuesto.

En 1961, Peter Mitchell, de la Universidad de Edinburgo, propuso un mecanismo radicalmente diferente para explicar el acoplamiento de oxidación a fosforilación, al cual denominó **quimiosmosis**. Casi todos los primeros investigadores en el campo de la bioenergética eran bioquímicos acostumbrados a estudiar las reacciones que ocurren en un medio soluble, sea en el tubo de ensaye o en la fase líquida de la célula. Pero se había demostrado que la fosforilación oxidativa estaba íntimamente relacionada con membranas celulares, ya fuese la membrana interna de la mitocondria o la membrana plasmática de bacterias aerobias. Mitchell pensó que la estructura de la membrana debía ser un factor clave en cualquier hipótesis para explicar la fosforilación oxidativa. Las primeras investigaciones de Mitchell acerca del transporte de membrana lo llevaron a apreciar el hecho de que las sustancias (electrones, iones, azúcares u otros compuestos) se desplazaban en una dirección específica (*vectorialmente*) de un lado de la membrana hacia el otro. Algunos de los primeros trabajos de Mitchell que lo llevaron a considerar movimientos vectoriales como clave de la fosforilación oxidativa fueron revisados por R.N. Robertson.³

En la teoría de la quimiosmosis, Mitchell propuso que el movimiento de los electrones a lo largo de la cadena respirato-

oxidar sus respectivos sustratos (fig. 5-30, b). El H_2O_2 generado en estas reacciones rápidamente se descompone por acción de la enzima catalasa, presente en elevada concentración en estos organelos. Igual que en la mitocondria, las proteínas encontradas entre los peroxisomas se sintetizan en el citoplasma y luego son importados al organelo después de su traducción.

El otro tipo principal de microcorpúsculos, los glioxisomas, contienen algunas de las mismas enzimas encontradas en los peroxisomas (como catalasa y enzimas para la oxidación de ácidos grasos), pero además contienen otras enzimas. Los glioxisomas son más prominentes en las plantas de semilla, que dependen de los ácidos grasos almacenados para obtener energía y materiales para iniciar la formación de una nueva planta (fig. 5-31). Una de las actividades metabólicas primarias en estas semillas germinantes es convertir los ácidos grasos almacenados en carbohidratos (gluconeogénesis). El desdoblamiento de los ácidos grasos almacenados genera acetil-CoA, que puede condensarse con oxalacetato para formar citrato, el cual a su vez puede convertirse en glucosa mediante una serie de enzimas localizadas en el glioxisoma.

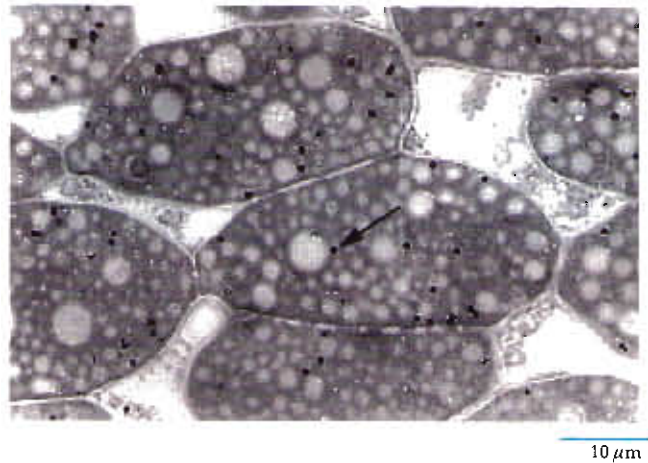


FIGURA 5-31. Localización del glioxisoma en semillas de planta. Micrografía de luz de una sección a través de los cotiledones de semillas de algodón embebidas. Los glioxisomas, que se observan como pequeñas estructuras oscuras (flecha), son visibles gracias a un procedimiento citoquímico que tiñe la enzima catalasa. (Según Kent D. Chapman y Richard N. Trelease, *J. Cell Biol.* 115:998, 1991; con permiso de Rockefeller University Press.)

ría da como resultado la translocación de protones de un lado de la membrana mitocondrial interna al otro.^{4,5} Mitchell llegó a esta conclusión luego de considerar la naturaleza de los portadores de electrones (pág. 184). La cadena respiratoria está constituida por dos tipos de portadores: unos que aceptan protones y electrones y otros que sólo pueden aceptar electrones. En la hipótesis quimiosmótica, Mitchell recalcó la importancia de la disposición espacial de los diferentes portadores entre la membrana transductora de energía. Sugirió que los portadores que se enlazan a protones y electrones (como las flavoproteínas) podrían estar en el lado interno de la membra-

na mitocondrial de modo que pudieran eliminar protones de la matriz. Para liberar estos protones en el otro lado, deben pasar electrones a los portadores del lado externo de la membrana que no aceptan protones (como los citocromos). Dada la organización apropiada de los portadores dentro de la membrana, se pueden pasar electrones a todo lo largo de la cadena hasta llegar al oxígeno, en tanto que los protones simplemente serían cambiados a través de la membrana en una sola dirección. El paso de un electrón desde un portador del lado interno a uno del lado externo y su regreso al lado interno constituye una *asa redox* (fig. VE 5-2, a). Inicialmente, la hipótesis

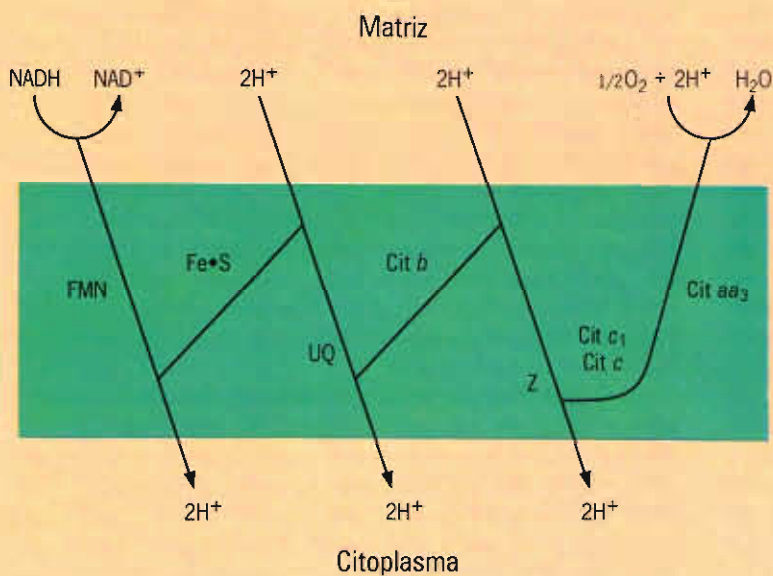


FIGURA VE 5-1. Modelo que muestra las tres aspas redox propuestas por Mitchell antes de 1970. En cada asa, un portador que transloca átomos de hidrógeno capta un par de protones en la superficie de la matriz. Cuando el portador del átomo de hidrógeno pasa su carga a un portador que sólo acepta electrones (p. ej., citocromos y proteínas Fe-S), los protones se descargan en el espacio intermembrana (y el citoplasma). Por consiguiente, cada asa transloca dos protones desde la matriz al interior del espacio intermembrana. Z es un portador hipotético de hidrógeno propuesto para mover protones, el cual permitiría que la citocromo oxidasa quedara como brazo transportador de electrones de la tercera asa redox. (Según THE VITAL FORCE: A STUDY OF BIOENERGETICS por F.M. Harold. © 1986 por W.H. Freeman and Company. Reimpreso con autorización.)

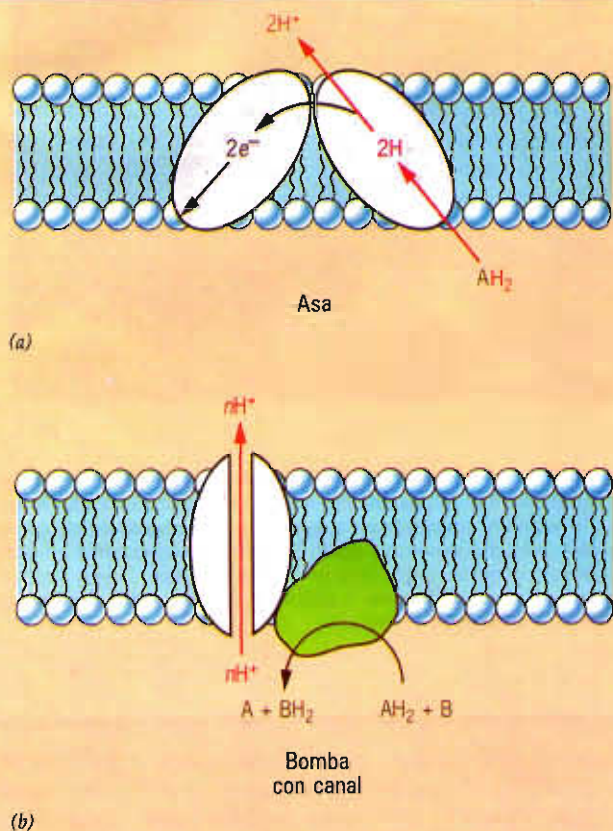


FIGURA VE 5-2. Modelos de asa (a) y de bomba (b) para translocación de protones. (Según Y. Kagawa, *Biochim. Biop. Acta* 505:76, 1978.)

quimiosmótica predijo la existencia de tres de tales asas, como se muestra en la figura VE 5-1. En la primera asa, por ejemplo, FMN H_2 porta un par de átomos de hidrógeno; los electrones serían transferidos a una proteína de hierro y azufre, en tanto que los protones se descartan en el lado externo de la membrana (citoplásmico).

Según la hipótesis quimiosmótica, el movimiento de protones a través de la membrana conduce al establecimiento de un gradiente electroquímico que representa el enlace de un intermediario de alta energía, procedente de la oxidación del sustrato, con la fosforilación del ADP. Para mantener el gradiente, Mitchell propuso que la membrana mitocondrial interna era bastante impermeable a protones y también a otras especies iónicas. Al mismo tiempo, reconoció que, según los tipos de sistema de transporte dentro de la membrana, la translocación de protones podría establecer un gradiente de pH, un gradiente eléctrico, o una combinación de ambos (pág. 190).

Una buena hipótesis debe hacer predicciones específicas que puedan probarse en forma experimental. La hipótesis quimiosmótica hizo algunas predicciones que estimularon un notable esfuerzo de investigación en el campo de la bioenergética. Entre las predicciones de la hipótesis quimiosmótica se incluyen las siguientes:

1. La oxidación del sustrato y el subsecuente transporte de electrones debe acompañarse de la liberación de protones.
2. Los portadores de electrones deben disponerse dentro de la membrana interna para formar asas redox que capten protones en un lado de la membrana y los liberen en el otro lado.
3. La membrana mitocondrial interna debe ser muy impermeable a protones. Además, agentes desacopladores, como el dinitrofenol, pueden actuar haciendo la membrana más permeable a protones, suprimiendo el gradiente electroquímico y por lo tanto suprimiendo la capacidad de los organelos para generar ATP.
4. Las mitocondrias que respiran activamente deben mostrar, a través de su membrana interna, un gradiente cuantificable de protones, un potencial eléctrico, o ambas cosas.
5. La presencia de un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna suministra la energía requerida para la fosforilación del ADP.

Consideremos brevemente algunos de los experimentos efectuados que apoyaron o refutaron estas predicciones.

A mediados del decenio de 1960, una serie de experimentos efectuados por Mitchell y Jennifer Moyle utilizando varios tipos de técnicas de titulación demostraron que la oxidación del sustrato por mitocondrias aisladas de hígado de rata se acompañaba de la expulsión de protones.^{6,7} En estos experimentos, las mitocondrias aisladas de hígado de rata se mantuvieron en condiciones anaerobias, lo cual desenergiza la membrana mitocondrial. Cuando se inyectó la suspensión de mitocondrias mediante un pulso breve de solución salina saturada de O_2 , Mitchell y Moyle pudieron descubrir acidificación del medio. Cuando los electrones se suministraron por el sustrato β -hidroxibutirato, que introduce electrones a la cadena respiratoria por la vía NADH, los cálculos de titulación sugirieron que se liberaban seis H^+ en el medio por cada átomo de O reducido por un par de electrones. Cuando se empleó succinato como sustrato, el cual transfiere electrones a FAD, sólo se generaron cuatro H^+ /O. La adición de dinitrofenol a la preparación mitocondrial inhibió la acidificación del medio.

La hipótesis quimiosmótica original predijo que los electrones transportados del NADH al O_2 atraviesan tres asas redox, en tanto que los transportados de $FADH_2$ atraviesan dos asas redox (fig. VE 5-1). Puesto que cada asa redox debe translocar dos protones por cada par de electrones transportados, los datos obtenidos por Mitchell y Moyle para la expulsión de protones se interpretaron como apoyo de la hipótesis. Otros laboratorios efectuaron experimentos similares utilizando diferentes técnicas para medir la concentración de protones y con frecuencia obtuvieron cifras diferentes, desencadenando una gran controversia acerca de la existencia de las asas redox translocadoras de protones.

Mitchell y Moyle efectuaron experimentos subsecuentes para medir hasta qué grado el gradiente electroquímico de protones estaba representado por el gradiente de protones en comparación con la diferencia de potencial eléctrico.⁸ La estimación de la diferencia de potencial a través de la membrana se efectuó midiendo la distribución de iones potasio a través de la membrana mitocondrial en presencia de valinomicina,

un compuesto que deja la membrana libremente permeable a iones K^+ . Cuanto mayor sea el voltaje a través de la membrana (interior negativo), mayor el número de iones K^+ que fluye al interior de la matriz como respuesta a la separación de carga antes de alcanzar el equilibrio. La diferencia de pH a través de la membrana mitocondrial se estimó a partir de la potencia amortiguadora de los compartimientos mitocondriales interno y externo, y a partir del cambio de pH del medio que ocurrió cuando se destruyó la membrana mitocondrial con detergente. Empleando estas técnicas, Mitchell y Moyle estimaron que la fuerza motriz total de protones era de casi 230 mV, y que el principal componente estaba representado por el potencial eléctrico. Estos valores aproximados fueron confirmados repetidamente.

Aunque Mitchell continuó apoyando la existencia de asas redox dentro de la cadena respiratoria,^{9,10} el consenso cambió a bombas de protones como mecanismo primario para la formación de un gradiente electroquímico de protones. A diferencia del asa redox, que requiere alternancia de transportadores de protones y de transportadores de no protones dentro de la membrana, una bomba de protones sólo requiere la presencia de una proteína que pueda mover protones a través de la membrana en respuesta al flujo de electrones. Las bombas de protones son como los otros tipos de transportadores de iones (sección 4-5) capaces de translocar iones como resultado de cambios de conformación que ocurren dentro de la proteína, según se describió para la ATPasa de Na^+-K^+ en la página 150. En la figura VE 5-2 se presenta un perfil esquemático de la diferencia entre un asa redox y una bomba de protones. Es importante observar que las asas y las bombas no son mecanismos mutuamente excluyentes. Es posible que algunos protones sean translocados como consecuencia de un asa redox y otros por una bomba de protones.

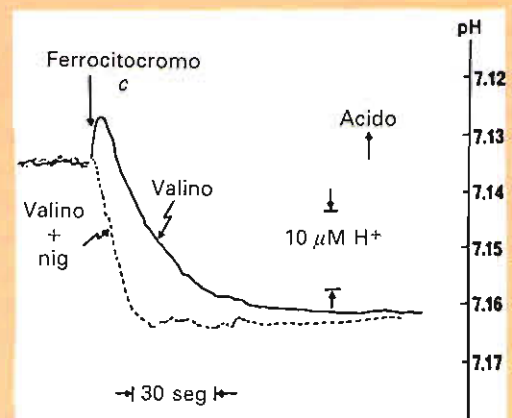
La demostración más directa de la existencia de las bombas de protones dentro de la cadena respiratoria proviene de la investigación de laboratorio de Marten Wikström, de la Universidad de Helsinki, iniciada a principios del decenio de 1970. Wikström enfocó su atención en la citocromo oxidasa, que según la hipótesis quimiostática original constituye el miembro transportador de electrones de la tercera asa redox (fig. VE 5-1). Puesto que la citocromo oxidasa consta de centros redox (hem y iones cobre) que sólo transportan electrones,

sería imposible, según la hipótesis quimiostática original, que este componente de la cadena respiratoria translocara protones. Pero Wikström y sus colegas demostraron que en realidad la citocromo oxidasa desplaza protones a través de la membrana, tanto si se encuentra dentro de la membrana mitocondrial como si se incorpora a vesículas artificiales.^{11,12} Para incorporar la enzima a las vesículas se dispersó citocromo oxidasa purificada en un medio que contenía fosfolípidos solubilizados con detergente. Cuando se eliminaron las moléculas del detergente mediante diálisis, las vesículas formadas contenían citocromo oxidasa integrada a la bicapa de lípidos. Cuando se añadió citocromo *c* reducido a una preparación de estas vesículas, se transfirieron electrones de las moléculas de citocromo *c* al O_2 . Si la citocromo oxidasa sólo actúa para transferir electrones, se podría esperar que el entorno se alcalinice debido al consumo de protones conforme se reduce el O_2 para producir H_2O . En vez de eso, el medio se volvió ácido (fig. VE 5-3), lo que indica expulsión de protones desde las vesículas. La tasa de acidificación es paralela a la tasa del flujo de electrones desde el citocromo *c* hasta el O_2 y fue suprimida por desacopladores, como el dinitrofenol. Estos resultados suministran una fuerte prueba de la capacidad inherente de la citocromo oxidasa para translocar protones a través de una membrana.

Mitchell no aceptó la conclusión de que la citocromoxidasa era una bomba de protones, sino que ofreció una versión modificada del modelo quimiosmótico, en el cual el segundo complejo podía translocar protones por medio de un "ciclo Q", en el cual las moléculas de ubiquinona captan protones en un lado de la membrana y los translocan al otro lado, donde los liberan. Según la proposición revisada de Mitchell, la citocromo oxidasa permanece como el miembro transportador de electrones de la última asa redox (fig. VE 5-4). La operación de un ciclo Q que mueve protones a través del complejo III ha recibido considerable apoyo, pero la demostración de que la citocromo oxidasa funciona como bomba de protones también es casi indiscutible.

La característica más importante de la hipótesis quimiosmótica propuesta por Mitchell en 1961 fue la idea de que la energía liberada por el transporte de electrones se almacenaba como un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana interna. Hemos descrito algunos de los experimentos que apoyan esta propuesta, en la actualidad aceptada casi

FIGURA VE 5-3. Expulsión de protones desde vesículas membranosas que contienen citocromo *c* oxidasa. Las vesículas se suspendieron en 0.1 M de KCl sin amortiguar. Luego de cinco minutos de preincubación se añadieron 10 μ l de una suspensión del donador de electrones ferrocitocromo *c* (o sea, citocromo *c* reducido) hasta lograr una concentración final de 2 μ M. La adición de ferrocitocromo produjo una expulsión inicial de protones, aumentando la acidez del medio. Esta expulsión fue contrarrestada por agentes desacopladores. La cantidad de protones expulsados inicialmente excede la concentración de citocromo oxidasa por casi dos órdenes de magnitud, lo que indica que los protones expulsados se derivan del espacio acuoso interno de las vesículas y que la función transportadora de protones de la citocromo oxidasa tal vez sea una propiedad intrínseca del complejo. (Según M.K.F. Wikström y H.T. Saari, Biochim. Biop. Acta 462:354, 1977.)



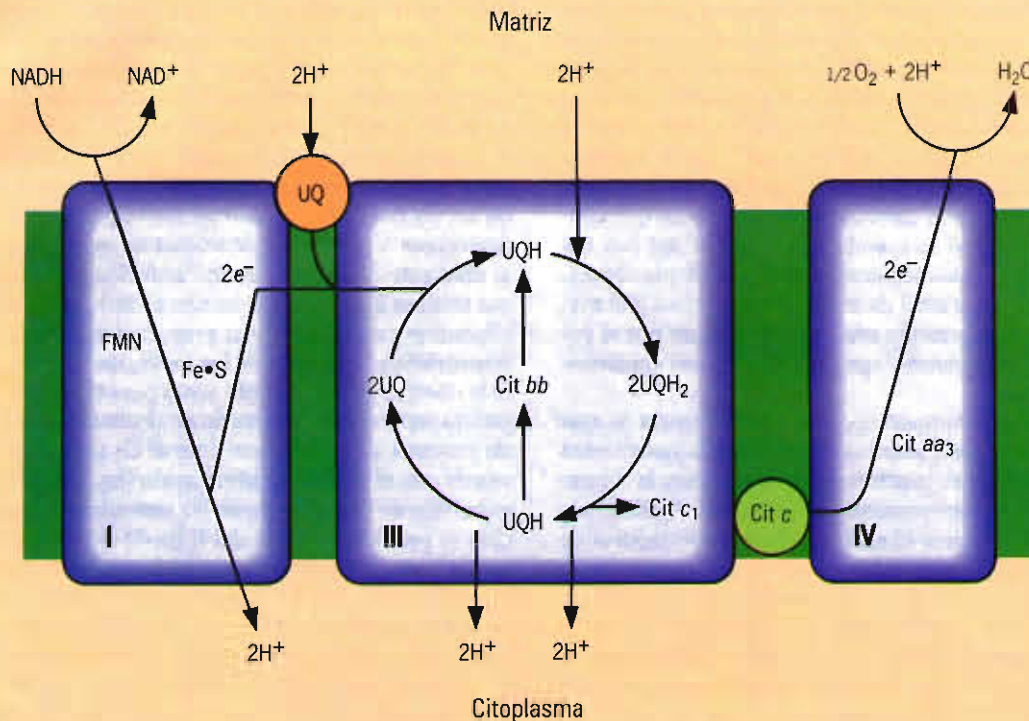


FIGURA VE 5-4. Este modelo, propuesto por Mitchell a finales del decenio de 1960, introdujo la idea de un ciclo Q capaz de translocar cuatro protones y prescindir de una tercera asa que implique citocromo oxidasa. El ciclo Q, cuyos detalles no se analizan, fue ampliamente adoptado para explicar la translocación de protones a través de la porción ubiquinona-complejo III de la cadena respiratoria. (Según THE VITAL FORCE: A STUDY OF BIOENERGETICS por F.M. Harold. © 1986 por W.H. Freeman and Company. Reimpreso con autorización.)

por toda la comunidad científica; los restantes argumentos se relacionan con detalles del mecanismo para generar y utilizar el gradiente. Antes de abandonar el tema de la quimiosmosis, es digno mencionar un par de experimentos clave que establecieron que el gradiente de protones generado por el transporte de electrones pueda efectuar la síntesis de ATP.

Según la hipótesis quimiosmótica, el gradiente electroquímico de protones constituye por sí mismo un estado de alta energía capaz de efectuar la fosforilación del ATP. Si esta interpretación es correcta, entonces el establecimiento de dicho gradiente por medios artificiales, o sea, transporte no relacio-

nado con electrones, también debe servir como fuerza impulsora para la formación de ATP. Esta predicción fue probada en 1966 en un ingenioso experimento efectuado por Andre Jagendorf y Ernest Uribe, de la Johns Hopkins University (fig. VE 5-5).¹³

Como se analiza en el siguiente capítulo, los cloroplastos generan ATP mediante un proceso denominado fotofosforilación, que utiliza el mismo mecanismo básico que gobierna la fosforilación oxidativa en las mitocondrias. Por lo tanto, la hipótesis quimiosmótica también se aplica a cloroplastos (y a la membrana plasmática de bacterias aerobias), igual que a las

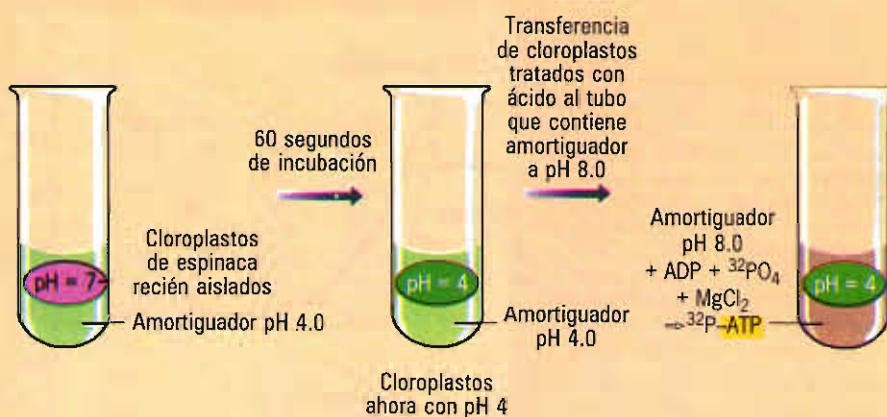


FIGURA VE 5-5. Producción de ATP en cloroplastos aislados mediante el establecimiento de un gradiente artificial de pH.

CUADRO VE 5-1. Cinética de la disminución alcalina y la fosforilación del ADP

Reacción	Rendimiento de ATP en el tiempo (seg)					
	0	2	4	6	30	60
Disminución de pH 8	41	7	1.7	1.1	0.4	—
ADP + P → ATP	3	27	48	47	42	47

FUENTE: A. Jagendorf y E. Uribe, *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* 55: 173, 1966.

CUADRO VE 5-1. El ATP se expresa en nmol/mg de clorofila. La disminución de la alcalinidad (renglón 1) se midió inyectando los cloroplastos ácidos en un medio amortiguado a pH 8 y esperando luego el número indicado de segundos antes de añadir ADP, Mg^{2+} , y fosfato marcado con ^{32}P , seguido por un lapso de 15 segundos estándar con estos reactivos antes de interrumpir la reacción por adición de ácido tricloroacético. El segundo renglón muestra el tiempo de fosforilación determinado inyectando cloroplastos acidificados en toda la mezcla de reacción de fosforilación y esperando el número indicado de segundos antes de interrumpir la reacción con ácido tricloroacético. En el renglón de arriba es evidente que cuanto más larga sea la espera antes de añadir los cloroplastos, menor será el ATP sintetizado, debido a que el gradiente de pH se disipa. En el segundo renglón, la cantidad de ATP sintetizada aumenta conforme el tiempo de incubación de la mezcla de reacción con el isótopo marcado aumenta hasta un punto cercano a seis segundos, cuando ya no se observó incremento adicional debido, una vez más, a que el gradiente de pH se disipa durante el periodo de síntesis de ATP.

mitocondrias. Jagendorf demostró desde el principio que la iluminación de cloroplastos aislados genera un gradiente de protones a través de las membranas del cloroplasto, de modo que el lado interno es ácido en relación con el externo. Para establecer un gradiente "artificial" a través de las membranas del cloroplasto, Jagendorf y Uribe prepararon cloroplastos aislados de células de espinaca y los suspendieron en la oscuridad en un tubo que contenía un amortiguador a pH 4 durante casi 60 segundos (fig. VE 5-5), tiempo requerido para que los protones del medio crucen la membrana del cloroplasto de modo que descendan el pH dentro de dicho compartimiento. Luego que el pH de los compartimientos internos del cloroplasto descendió a 4 aproximadamente, se inyectaron en la oscuridad los cloroplastos acidificados dentro de un segundo tubo que contenía un medio amortiguado a pH 8 junto con las sustancias necesarias para sintetizar ATP radiactivo. La transferencia de los cloroplastos al amortiguador alcalino generó un gradiente transitorio de H^+ 10 000 veces mayor (10^{-8} M $[H^+]$ en comparación con 10^{-4} M $[H^+]$) a través de las membranas internas del cloroplasto. Unos cuantos segundos después de la transferencia se pudo descubrir ATP recién sintetizado (línea 2, cuadro VE 5-1). Los resultados indican que un gradiente de pH, por sí mismo, puede efectuar la fosforilación del ADP.

En 1974, Efraim Racker y Walter Stoeckenius¹⁴ efectuaron un segundo experimento ingenioso que ilustró la potencia de un gradiente de protones para formar ATP. Recordemos de la página 150, capítulo 4, que las bacterias púrpura del género *Halobacterium* poseen una proteína denominada bacteriorrodopsina, la cual actúa como bomba de protones operada por luz.

Cuando se incorpora bacteriorrodopsina en vesículas artificiales de fosfolípidos, esta proteína establece un gradiente de protones a través de la membrana vesicular después de ser iluminada. Si se prepararon vesículas artificiales que contenían tanto bacteriorrodopsina como ATP-sintasa mitocondrial purificada, la iluminación de las vesículas en presencia de ADP y P_i se acompaña de la síntesis de ATP. Claramente, el gradiente de protones generado por una bomba bacteriana operada por luz fue capaz de efectuar la fosforilación del ADP utilizando la maquinaria enzimática de la mitocondria.

Los resultados de estos dos últimos experimentos son importantes por muchas razones. No sólo demostraron que un gradiente electroquímico puede suministrar energía libre para formar ATP, sino también indican qué transporte de electrones y síntesis de ATP no necesitan estar directamente acoplados. En estos experimentos no hubo transporte alguno de electrones; por lo tanto, se puede concluir que la fosforilación puede ocurrir independientemente del transporte de electrones. En condiciones normales, el transporte de electrones genera un estado de alta energía empleado para la fosforilación, pero no hay condiciones particulares para que ese estado de alta energía no pueda satisfacerse con un gradiente generado de otra manera.

BIBLIOGRAFÍA

- Engelhardt, V.A. 1932. *Biochemische. Zeitsch.* 251:343-368. (Descrito por E.C. Slater en *Trends in Biochem. Sci.* 6:226-227, 1981.)
- Slater, E.C. 1953. Mechanism of phosphorylation in the respiratory chain. *Nature* 172:975-978.
- Robertson, R.N. 1960. Ion transport and respiration. *Biol. Revs.* 35:231-264.
- Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191:141-148.
- Mitchell, P. 1963. Molecule, group, and electron translocation through natural membranes. *Biochem. Soc. Symp.* 22:142-168.
- Mitchell, P. y Moyle, J. 1965. Stoichiometry of proton translocation through the respiratory chain and adenosine triphosphatase system of rat liver mitochondria. *Nature* 208:147-151.
- Mitchell, P. y Moyle, J. 1967. Acid-base titration across the membrane system of rat-liver mitochondria. *Bioch. J.* 104:588-600.
- Mitchell, P. y Moyle, J. 1969. Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. *Europ. J. Biochem.* 7:471-484.
- Mitchell, P. 1987. A new redox loop formality involving metal-catalysed hydroxide-ion translocation. *FEBS Lett.* 222:235-245.
- Mitchell, P. 1988. Strategy of research on the chemiosmotic mechanism of cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 231:270-271.
- Wikström, M.K.F. y Saari, H.T. 1977. The mechanism of energy conservation and transduction by mitochondrial cytochrome c oxidase. *Biochem. Biop. Acta* 462:347-361.
- Krab, K. y Wikström, M. 1978. Proton-translocating cytochrome c oxidase in artificial phospholipid vesicles. *Bioch. Biop. Acta* 504:200-214.
- Jagendorf, A. y Uribe E. 1966. ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 55:170-177.
- Racker, E. y Stoeckenius, W. 1974. Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation. *J. Biol. Chem.* 249:662-663.

SINOPSIS

Las mitocondrias son grandes organelos constituidos por una membrana porosa externa y una membrana interna altamente permeable y plegada (cresta) que contiene gran parte del mecanismo requerido para la respiración aerobia. La porosidad de la membrana externa es resultado de la presencia de proteínas integrales denominadas porinas. La arquitectura de la membrana interna y la aparente fluidez de su bicapa facilitan la interacción de los componentes requeridos durante el transporte de electrones y la formación de ATP. La membrana interna rodea una matriz parecida a un gel que contiene, además de proteínas, un sistema genético que incluye DNA, RNA, ribosomas y todos los mecanismos necesarios para transcribir y traducir información genética. Muchas de las propiedades de la mitocondria se pueden explicar al asumir que evolucionaron a partir de antiguas bacterias simbióticas (p. 172).

La mitocondria es el centro del metabolismo oxidativo de la célula que convierte los productos del catabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas en energía química almacenada en ATP. Piruvato y NADH son los dos productos de la glucólisis. El piruvato es transportado a través de la membrana mitocondrial interna, donde sufre descarboxilación y se combina con la coenzima A para formar acetil-CoA, que se condensa con oxalacetato para formar citrato, el cual ingresa al ciclo del ácido tricarboxílico. Conforme el citrato sufre las reacciones del ciclo del ácido tricarboxílico, dos de sus carbonos son eliminados y liberados en forma de CO_2 , que representa el estado más altamente oxidado de los átomos de carbono. Los electrones eliminados de los sustratos se transfieren a FAD y NAD^+ para formar FADH_2 y NADH. Los ácidos se descomponen en acetil-CoA, que ingresa al ciclo del ácido tricarboxílico, y todos los 20 aminoácidos se desdoblan para piruvato, acetil-CoA o intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico. Por lo tanto, dicho ciclo es el camino en el cual convergen las principales vías metabólicas de la célula (p. 175).

Los electrones transferidos desde los sustratos a FADH_2 y NADH siguen a lo largo de una cadena portadora de electrones hacia O_2 , liberando energía que se emplea para generar un gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna. El movimiento controlado de protones que regresan a través de la membrana por medio de una enzima sintetizadora de ATP se emplea para la formación de ATP en el sitio catalítico de la enzima. Cada par de electrones de NADH libera suficiente energía para formar casi tres ATP, en tanto que la energía liberada de un par de electrones de FADH_2 explica la formación de casi dos ATP (p. 179).

La cantidad de energía liberada en forma de electrones se transfiere de un donador (agente reductor) a un aceptor (agente oxidante) y puede calcularse a partir de la diferencia del potencial redox entre dos pares. El potencial redox estándar de un par se mide en condiciones estándar y se compara con el par $\text{H}_2\text{-H}^+$. El potencial redox estándar del par NADH-NAD^+ es -0.32 V , que refleja el hecho de que NADH es un agente reductor fuerte, o sea, uno que transfiere con rapidez sus elec-

trones. El potencial redox estándar del par $\text{H}_2\text{O/O}_2$ es $+0.82\text{ V}$, que refleja el hecho de que O_2 es un fuerte agente oxidante, o sea, uno que tiene gran afinidad por electrones. La diferencia entre estos dos pares, equivalente a 1.14 V , proporciona una medida de la energía libre liberada (52.6 kcal/mol) cuando un par de electrones pasa del NADH a lo largo de toda la cadena transportadora de electrones hasta el O_2 (p. 181).

La cadena transportadora de electrones contiene cuatro tipos diferentes de transportadores: citocromos que contienen hem, flavoproteínas que contienen nucleótidos con flavina, proteínas de hierro y azufre, y quinonas. Flavoproteínas y quinonas pueden aceptar y donar átomos de hidrógeno, en tanto que citocromos y proteínas de hierro y azufre sólo aceptan y donan electrones. Los portadores de la cadena de transporte de electrones están dispuestos espacialmente en orden decreciente de potencial redox. Los diferentes transportadores se organizan en cuatro grandes complejos de multiproteínas. Citocromo c y ubiquinonas son portadores móviles que intercambian electrones entre los complejos más grandes. Conforme los pares de electrones pasan a través de los complejos I, III y IV, se translocan un número específico de protones desde la matriz a través de la membrana al interior del espacio intermembrana. La translocación de protones por estos complejos transportadores de electrones establece el gradiente de protones en el cual se almacena la energía. El último de los complejos es la citocromo oxidasa, que transfiere electrones desde el citocromo c al O_2 y lo reduce para formar agua, un paso que también elimina protones de la matriz y contribuye al gradiente de protones (p. 184).

La translocación de protones genera separación de cargas a través de la membrana, además de una diferencia en la concentración de protones. Por consiguiente, el gradiente de protones tiene dos componentes: un gradiente de voltaje y uno de pH; la magnitud de éstos depende del movimiento de otros iones a través de la membrana. Los dos componentes juntos constituyen una fuerza motriz de protones (Δp). En mitocondrias de mamíferos se estima que casi 80% de la energía libre de la Δp está representada por el gradiente de voltaje, y 20% por el gradiente de pH (p. 185).

La enzima que cataliza la formación de ATP es un complejo grande de múltiples proteínas denominado ATP sintasa que contiene dos partes diferentes: una pieza cabeza F_1 que se proyecta al interior de la matriz e incluye un sitio catalítico, y una pieza basal F_0 integrada a la bicapa de lípidos y que forma un canal a través del cual se conducen protones desde el espacio intermembrana hasta la enzima. Se cree que el movimiento controlado de protones a través de la ATP sintasa induce cambios de conformación para la formación de ATP. La hipótesis aceptada en la actualidad propone que cada uno de los tres sitios catalíticos de la porción F_1 de la enzima se encuentra en estados de conformación diferentes, designados firme, laxo y abierto. Cada sitio se mueve de una conformación a la siguiente en respuesta a la unión y liberación de protones. Las pruebas indican que el paso que requiere ener-

gía no es en realidad la fosforilación del ADP, sino la unión de nucleótidos al sitio activo, la liberación del sitio activo del ATP producido, o ambos. Se cree que los cambios de conformación son gobernados por el movimiento de protones a través de la enzima y estos pasos se efectúan mediante cambios de afinidad del sitio activo hacia los nucleótidos. Además de la formación de ATP, la fuerza motriz de protones también suministra la energía necesaria para algunas actividades de transporte, incluyendo captación de ADP en la mitocondria durante los cambios para liberar ATP del citoplasma, captación de iones fosfato y calcio, e importación de proteínas mitocondriales (p. 191).

Las proteínas que constituyen una mitocondria pueden ser: 1) **codificadas en el DNA mitocondrial y sintetizadas en el organelo, o 2) sintetizadas en el citoplasma e importadas al organelo luego de la traducción.** Las proteínas mitocondriales sintetizadas en el citoplasma contienen una secuencia orientadora con carga positiva en su N-terminal, que provoca la unión del polipéptido con su receptor en la superficie externa de la mitocondria; esto da lugar al transporte del polipéptido a través de la membrana mitocondrial hacia el interior de la matriz. La importación puede auxiliarse mediante chaperones situados tanto en el citoplasma como en la matriz mitocondrial (p. 197).

PREGUNTAS DE REPASO

1. Describir los cambios en el metabolismo oxidativo que debieron haber acompañado a la evolución y el éxito de las cianobacterias.
2. Comparar las propiedades de las membranas mitocondriales interna y externa; el espacio intermembrana y la matriz.
3. ¿Cómo se conectan los productos de la glucólisis a las reacciones del ciclo del ácido tricarboxílico?
4. ¿Por qué se considera el ciclo del ácido tricarboxílico como la vía central del metabolismo energético de una célula?
5. Describir el mecanismo mediante el cual el NADH producido por glucólisis puede ingresar electrones al ciclo del ácido tricarboxílico.
6. Describir de qué manera el transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria establece un gradiente de protones.
7. ¿Cuáles son algunas de las principales actividades de los peroxisomas? ¿Cuál es el papel de la catalasa en esas actividades?
8. ¿Cómo algunas proteínas, como las enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico, pueden llegar a la matriz mitocondrial?
9. Observar la figura 5-12 y describir en qué son similares los estados semiquinona de la ubiquinona y la FMN.
10. ¿Qué debe entenderse por centro binuclear de la citocromo oxidasa? ¿Cómo funciona en la reducción de O_2 ?
11. ¿Cuáles son las dos maneras diferentes en que contribuye la citocromo oxidasa al gradiente de protones?
12. ¿En qué difiere el transporte de electrones de uno de los grandes complejos de la cadena transportadora de electrones del transporte de electrones entre los complejos?
13. ¿Por qué la transferencia de algunos electrones da como resultado mayor liberación de energía en comparación con otros tipos de transferencia?
14. ¿Cuáles son los dos componentes de la fuerza motriz de protones y cómo pueden sus contribuciones relativas variar de una célula a otra?
15. ¿Cuál es el efecto del dinitrofenol sobre la síntesis de ATP en la mitocondria? ¿Qué es lo que ocurre? ¿Cómo se vincula el gradiente de protones a la síntesis de ATP?
16. Describir la estructura básica de la ATP-sintasa y el mecanismo para sintetizar ATP.

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. Considerar la reacción $A:H + B \rightleftharpoons B:H + A$. Si en el equilibrio la proporción $[B:H]/[B]$ es igual a 2.0, se puede concluir que: 1) B:H es el agente reductor más fuerte de los cuatro compuestos; 2) el par (A:H, A) tiene el potencial redox más negativo en comparación con el par (B:H, B); 3) ninguno de los cuatro compuestos son citocromos; 4) los electrones relacionados con B son de más alta energía que los relacionados con A. ¿Cuáles de las afirmaciones previas son ciertas? Dibujar la reacción en uno de los sentidos de esta reacción redox.
2. La vesícula membranosa de una partícula submitocondrial, luego de eliminar las esferas F_1 , sería capaz de: 1) oxidar NADH; 2) producir H_2O a partir de O_2 ; 3) generar un gradiente de protones; 4) fosforilar ADP. ¿Cuáles de las afirmaciones previas son ciertas? ¿En qué serían diferentes estas respuestas, si es que hay alguna diferencia, si los objetos estudiados fueran partículas submitocondriales intactas tratadas con dinitrofenol?
3. La proteína A es una flavoproteína con potencial redox de -0.2 V. La proteína B es un citocromo con potencial redox de $+0.1$ V.
 - a. Dibujar las reacciones en ambos sentidos para cada uno de los dos portadores de electrones.
 - b. Escribir la reacción que ocurriría si se añadieran a la mezcla moléculas A reducidas y moléculas B oxidadas.
 - c. ¿Cuál de los dos compuestos en la reacción de la parte b estaría presente en concentración más alta cuando la reacción alcanzara el equilibrio?
4. De las siguientes sustancias: ubiquinona, citocromo c, NAD^+ , NADH, O_2 , H_2O , ¿cuál es el agente reductor más fuerte? ¿cuál es el agente oxidante más fuerte? ¿cuál tiene mayor afinidad por electrones?
5. Si se determina que la membrana mitocondrial interna es libremente permeable a iones cloro, ¿qué efecto tendría esto sobre la fuerza motriz de protones a través de la membrana mitocondrial interna?

6. Observar el descenso de energía durante el transporte de electrones mostrado en la figura 5-14. ¿Ese perfil sería diferente si el donador original de electrones fuera FADH_2 en vez de NADH ?
7. ¿Sería de esperar que la importación de sustancias como ADP o P_i disminuyera la fuerza motriz de protones? ¿Por qué?
8. En los potenciales redox estándar del cuadro 5-1, el par oxalacetato-malato es menos negativo que el par NAD^+ - NADH . ¿Cómo pueden ser estos valores compatibles con la transferencia de electrones de malato a NAD^+ en el ciclo del ácido tricarboxílico?
9. ¿Cuántos fosfatos de alta energía se forman mediante fosforilación a nivel de sustrato durante cada vuelta del ciclo del ácido tricarboxílico (considerar sólo reacciones de este ciclo)? ¿Cuántos se forman como resultado de la fosforilación oxidativa? ¿Cuántas moléculas de CO_2 se liberan? ¿Cuántas moléculas de FAD se reducen? ¿Cuántos pares de electrones se extraen de los sustratos?
10. Los protones se mueven en ambas direcciones a través de la membrana mitocondrial interna. Se mueven en una dirección como resultado del transporte de electrones. ¿Cuál es la causa de que se muevan en la dirección opuesta?
11. El descenso en ΔG° de un par de electrones es -52.6 kcal/mol y la ΔG° de la formación de ATP es $+7.3 \text{ kcal/mol}$. Si se forman tres ATP por cada par de electrones eliminados de un sustrato, ¿se puede concluir que la fosforilación oxidativa es de $21.9/52.6$, o 42% eficiente? ¿Por qué sí o por qué no? (No basta afirmar que la célula no opera en condiciones estándar.)
12. ¿Es de esperar que mitocondrias aisladas, metabólicamente activas, acidifiquen o alcalinicen el medio en el cual están suspendidas? ¿Sería la respuesta diferente si estuviera trabajando con partículas submitocondriales en vez de mitocondrias? ¿Por qué?
13. A veces se requiere el movimiento de tres protones para la síntesis de una molécula de ATP (fig. 5-28). Calcular la energía liberada por el paso de protones al interior de la matriz (véase página 191 para información).
14. ¿Por qué sería de esperar que el movimiento de protones al interior del espacio intermembrana tuviera efecto sobre las enzimas del citoplasma?
15. Calcular la energía libre liberada cuando FADH_2 se oxida mediante O_2 molecular en condiciones estándar.

BIBLIOGRAFIA

Estructura y función de la mitocondria

- Babcock, G.T. y Wikström, M. 1992. Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* 356:301-309.
- Boyer, P.D. 1989. A perspective on the binding change mechanism for ATP synthesis. *FASEB J.* 3:2164-2178.
- Calhoun, M.W., Thomas J.W. y Gennis, R.B. 1994. The cytochrome oxidase superfamily of redox-driven proton pumps. *Trends Biochem. Sci.* 19:325-330.
- Capaldi, R.A. 1990. Structure and function of cytochrome *c* oxidase. *Ann. Rev. Biochem.* 59:569-596.
- Capaldi, R. 1994. $\text{F}_1\text{-ATPase}$ in a spin. *Nature Struct. Biol.* 1:660-663.
- Chan, S.I. y Li, P.L. 1990. Cytochrome *c* oxidase: Understanding nature's design of a proton pump. *Biochem.* 29:1-12.
- Chen, L.B. 1988. Mitochondrial membrane potential in living cells. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4:155-181.
- Ernster, L. y Schatz, G. 1981. Mitochondria: A historical review. *J. Cell Biol.* 91:227S-255S.
- Futai, M. y cols. 1989. ATP synthase (H^+ - ATPase): Results by combined biochemical and molecular biological approaches. *Ann. Rev. Biochem.* 58:111-136.
- Hahn, J.B. 1990. Behavior of mitochondria in the living cell. *Int. Rev. Cytol.* 122:1-63.
- Harold, F.M. 1986. *The Vital force: A Study of Bioenergetics*. W.H. Freeman.
- Hatefi, Y. 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann. Rev. Biochem.* 54:1015-1069.
- Nicholls, D.G. y Ferguson, S.J. 1992. *Bioenergetics*. Academic Press.
- O'Brien, C. 1994. New enzyme structure reveals cell's rotary engine. *Science* 265:1176-1177.

Penefsky, H.S. y Cross, R.L. 1991. Structure and mechanism of F_0F_1 -type ATP synthases and ATPases . *Adv. Enz.* 64:173-214.

Slater, E.C. 1981. The discovery of oxidative phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* 6:226-227.

Weiss, H. y cols. 1991. The respiratory chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 197:563-576.

Importación de proteínas al interior de la mitocondria

- Payton, R.O. y cols. 1992. Protein export from the mitochondrial matrix. *Trends Cell Biol.* 2:369-375.
- Pfanner, M. 1992. A dynamic model of the mitochondrial protein import machinery. *Cell* 68:999-1002.
- Stuart, R.A. y cols. 1994. Mitochondrial molecular chaperones: Their role in protein translocation. *Trends Biochem. Sci.* 19:87-92.
- Wickner, W.T. 1994. How ATP drives proteins across membranes. *Science* 266:1197-1198.
- Wienhaus, U. y Neupert, W. 1992. Protein translocation across mitochondrial membranes. *Bioess.* 14:17-23.

Peroxisomas

- Lazarow, P.B. 1993. Genetic approaches to studying peroxisome biogenesis. *Trends Biochem. Sci.* 3:89-93.
- Subramani, S. 1993. Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9:445-478.
- Valle, D. y Gartner, J. 1993. Penetrating the peroxisome. *Nature* 361:682-683.
- van den Bosch, H. y cols. 1992. Biochemistry of peroxisomes. *Ann. Rev. Biochem.* 61:157-197.

Fotosíntesis y cloroplastos

6-1 Estructura y función del cloroplasto

6-2 Revisión del metabolismo fotosintético

6-3 Absorción de luz

6-4 Unidades fotosintéticas y centros de reacción

6-5 Fotofosforilación

6-6 Fijación de dióxido de carbono y formación de carbohidratos

La perspectiva humana: “Mejores” plantas por medio de ingeniería genética

La vía experimental: Organización de la membrana tilacoide

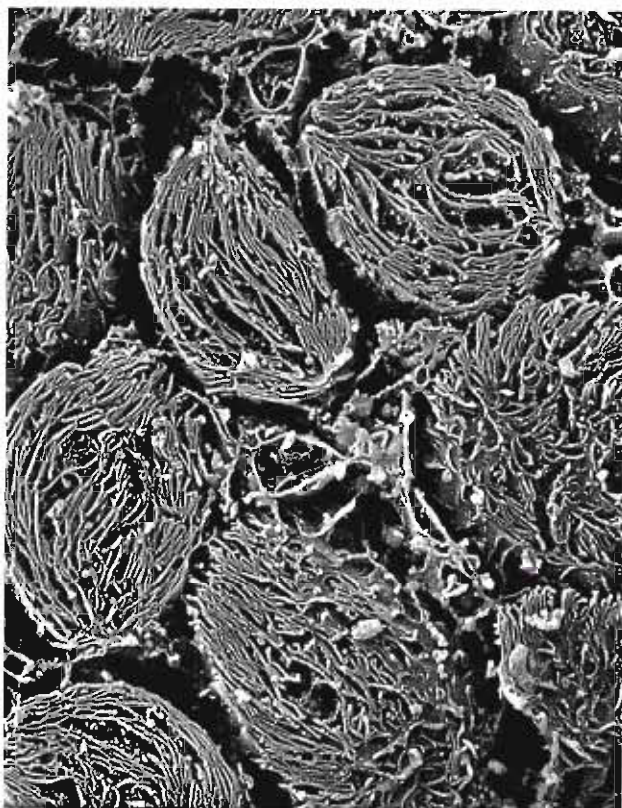


FIGURA 6-A. Cloroplastos en una hoja de *Arabidopsis thaliana*, miembro de la familia de las mostazas, vistos con criorrastreo mediante microscopio electrónico. (Cortesía de Richard J. Howard, DuPont Company.)

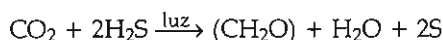
Las formas primitivas de vida sobre la Tierra debieron haber obtenido sus materias primas y energía a partir de moléculas orgánicas simples disueltas en su ambiente acuoso. Estas moléculas orgánicas con certeza se formaron a partir de procesos *abióticos*, o sea, como resultado de reacciones químicas no biológicas que ocurrían en los mares primitivos. Por lo tanto, así como nosotros sobrevivimos de nutrientes tomados de nuestro ambiente, así también debieron haberlo hecho las formas originales de vida. Los organismos que dependen de una fuente externa de compuestos orgánicos se llaman **heterotrofos**.

Así como todos los organismos vivientes fueron heterotrofos, la oportunidad de la biomasa sobre la Tierra para aumentar estaba gravemente restringida, ya que la producción espontánea de moléculas orgánicas era muy lenta. El desarrollo de la vida sobre la Tierra recibió un tremendo impulso con la evolución de organismos que emplearon una nueva estrategia metabólica que les permitió sobrevivir a partir de moléculas que eran mucho más abundantes que la escasa variedad orgánica. Este nuevo tipo de organismos tenía capacidad de elaborar sus propios nutrientes orgánicos a partir de moléculas de los tipos más simples, como el dióxido de carbono (CO_2) y el sulfuro de hidrógeno (H_2S). Los organismos capaces de sobrevivir con CO_2 como principal fuente de carbono se denominan **autotrofos**.

La elaboración de moléculas complejas a partir de CO_2 requiere el ingreso de grandes cantidades de energía. En el curso de la evolución se desarrollaron dos tipos principales de autotrofos que pueden distinguirse por su fuente de energía. Los **químioautotrofos** utilizan energía almacena-

da en moléculas inorgánicas (como amonio, sulfuro de hidrógeno o nitritos) para convertir CO_2 en compuestos orgánicos, en tanto que los **fotoautotrofos** emplean la energía radiante del sol para efectuar esa tarea. Puesto que todos los quimioautotrofos son bacterias y su contribución relativa a la formación de biomasa sobre la Tierra es pequeña, no consideraremos más sus actividades metabólicas. Por otro lado, los fotoautotrofos se encargan de capturar la energía que sirve como combustible para las actividades de casi todos los organismos sobre la Tierra. Los fotoautotrofos incluyen plantas evolutivamente organizadas y algas eucariotas; varios protistas flagelados, y una variedad de procariotes, incluyendo bacterias púrpura azufrosas y no azufrosas, bacterias verdes y cianobacterias. Todos estos organismos efectúan fotosíntesis, proceso en el cual la energía de la luz solar se transforma en energía química, la cual se utiliza en la formación de carbohidrato y otros metabolitos orgánicos.

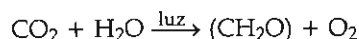
Como analizaremos en detalle en este capítulo, la fotosíntesis es un proceso en el cual los electrones de energía relativamente baja son eliminados de un compuesto donador y convertidos en electrones de alta energía como resultado de la absorción de luz. Estos electrones de alta energía pueden utilizarse entonces en vías anabólicas en las cuales se sintetizan moléculas biológicas reducidas, como almidón y aceites. Es probable que los primeros grupos de fotoautotrofos que dominaron el planeta durante casi 2 000 millones de años utilizaran sulfuro de hidrógeno como fuente de electrones para la fotosíntesis, efectuando la reacción total



donde (CH_2O) representa una unidad de carbohidrato.

En la actualidad hay numerosas bacterias vivientes que efectúan este mismo tipo de fotosíntesis, pero el sulfuro de hidrógeno ya no es abundante ni extenso, y en consecuencia los organismos que dependen de este compuesto como fuente de electrones están inevitablemente restringidos en cuanto a importancia y distribución.

Hace aproximadamente 2 500 millones de años apareció un nuevo tipo de procariote fotosintético sobre la Tierra capaz de utilizar una fuente mucho más abundante de electrones, es decir, el agua. El empleo del agua no sólo permitió a estos organismos, o cianobacterias, explotar una mayor diversidad de hábitats sobre la Tierra, sino que también produjo un material de desperdicio de enormes consecuencias para todas las formas de vida. El producto de desperdicio fue el oxígeno molecular (O_2) formado en la reacción total:



La evolución de un tipo de fotosíntesis que libera oxígeno (*oxigénica*) no sólo abrió el camino para que las cianobacterias se convirtieran en la forma dominante de vida sobre la tierra, sino que también suministró la oportunidad a los organismos para evolucionar hacia un metabolismo aerobio. Como veremos en el último capítulo, la respiración aerobia permite a los organismos extraer una cantidad mucho mayor de energía de los nutrientes en comparación con la que se puede obtener por vías anaerobias, como glucólisis y fermentación. El cambio de H_2S a H_2O como "combustible"

para la fotosíntesis es más complicado que cambiar una letra del alfabeto por otra. El potencial redox del par $\text{S-H}_2\text{S}$ es de -0.25 V en comparación con $+0.816\text{ V}$ para el par $\frac{1}{2}\text{O}_2\text{-H}_2\text{O}$ (pág. 190). En otras palabras, el átomo de azufre en una molécula de H_2S tiene mucha menor afinidad por sus electrones (y por lo tanto los dona con mayor rapidez) que el átomo de oxígeno en una molécula de H_2O . Por lo tanto, cuando un organismo debe adquirir electrones del agua tiene que generar un agente oxidante muy fuerte como parte de su metabolismo fotosintético. El cambio de H_2S a H_2O como fuente de electrones para la fotosíntesis requirió una transformación completa del mecanismo fotosintético.

Iniciaremos nuestro análisis de la fotosíntesis examinando brevemente los organelos en los cuales ocurre el proceso.

6-1 Estructura y función del cloroplasto

La fotosíntesis comparte muchas características con la respiración aerobia, incluyendo un sistema de transporte de electrones que consta de citocromos, quinonas y proteínas de hierro y azufre; el establecimiento de un gradiente electroquímico de protones, y el empleo de este gradiente para efectuar la síntesis de ATP a través de una ATP-sintasa homóloga. Por lo tanto, no es sorprendente que, como en la respiración aerobia, los sucesos de la fotosíntesis estén íntimamente vinculados a la membrana celular. La fotosíntesis no oxigénica del tipo efectuado por la bacteria púrpura se realiza en componentes que residen en la membrana plasmática o en vesículas derivadas de la membrana plasmática por invaginación (fig. 6-1, *a*). Por lo contrario, el mecanismo fotosintético oxigénico de las cianobacterias reside en una elaborada disposición de verdaderas membranas citoplásmicas que forman vallas o laminillas, como se muestran en la figura 6-1, *b*.

En las células eucariotas, la fotosíntesis tiene lugar en un organelo citoplásmico especializado, el **cloroplasto**, localizado predominantemente en las células mesófilas de las hojas. En la figura 6-2 se muestran la estructura de una hoja y la disposición de los cloroplastos alrededor de la vacuola central de una célula mesófila. Los cloroplastos de plantas evolutivamente elevadas por lo general tienen forma lenticular (fig. 6-3), unos 2 a 4 μm de ancho y 5 a 10 μm de largo, y en condiciones típicas su número varía entre 20 y 40 por cada célula. Estas dimensiones colocan al cloroplasto como gigante entre los organelos, de igual tamaño que el eritrocito completo estudiado en el capítulo 4. Los cloroplastos se identificaron como sitio de la fotosíntesis en 1881 en un ingenioso experimento efectuado por el biólogo alemán Theodor Engelmann, quien demostró que cuando se iluminan las células del alga verde *Spyrogyra*, algunas bacterias se desplazan activamente para agruparse en el exterior de las células cerca del sitio correspondiente a los grandes cloroplastos acintados. Las bacterias estaban utilizando las mínimas cantidades de oxígeno liberadas en el cloroplasto por la fotosíntesis para estimular su respiración aerobia.



(a) 0.4 μm



(b) Tilacoides

FIGURA 6-1. Dos tipos diferentes de bacterias fotosintéticas. a) Bacteria *Rhodospseudomonas spheroides* cuyo mecanismo de fotosíntesis está contenido en vesículas derivadas por invaginación de la membrana plasmática. b) Cianobacteria *Anacystis nidulans*, cuyo aparato fotosintético se aloja en las laminillas tilacoides. (a. Según K. Menke, en T.W. Goodwin, ed., *Biochemistry of Chloroplasts*, vol. 1, Academic Press, 1966; b. según Norma J. Lang y B.A. Whitton, eds. *Biology of the Blue-Green Algae*, Blackwell Science Ltd., 1973.)

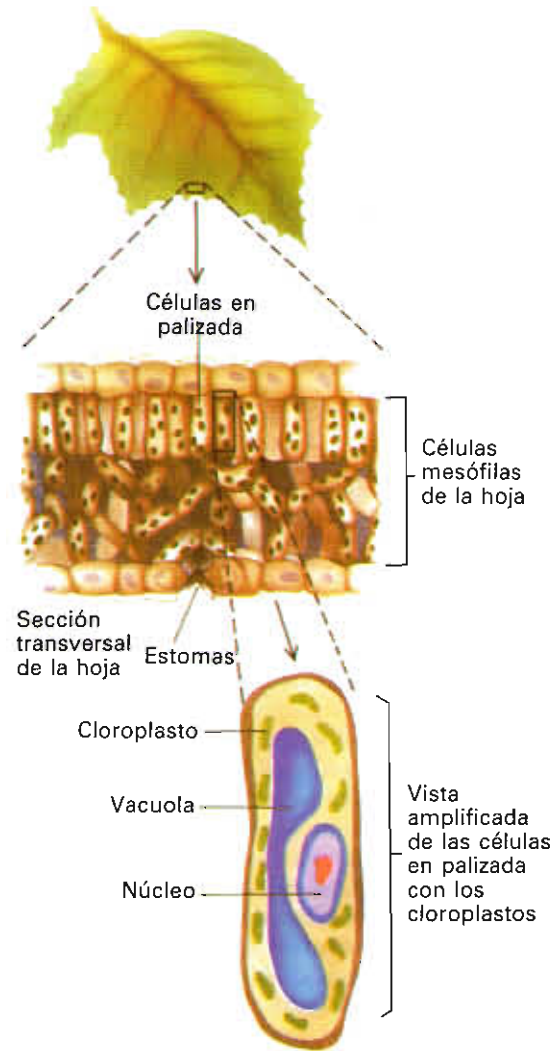


FIGURA 6-2. Organización funcional de una hoja. La sección transversal de una hoja muestra varias capas de células, incluyendo células en palizada, un tipo de células mesófilas que contienen los cloroplastos encargados de efectuar la fotosíntesis y suministrar la materia prima y energía química para toda la planta.

La cubierta externa del cloroplasto consta de una envoltura compuesta de dos membranas separadas por un espacio estrecho (fig. 6-3). Igual que la membrana externa de las mitocondrias, la membrana externa del cloroplasto contiene porinas (pág. 173) que hacen a esta membrana permeable a solutos de peso molecular tan alto como 10 000 daltons. En contraste, la membrana interna de dicha envoltura es relativamente impermeable; las sustancias que se mueven a través de dicha membrana interna lo hacen con ayuda de varios transportadores.

Gran parte del mecanismo de síntesis de los cloroplastos, incluyendo pigmentos que absorben luz, una compleja cadena transportadora de electrones y un aparato sintetizador de ATP, se localiza en un sistema de la membrana inter-

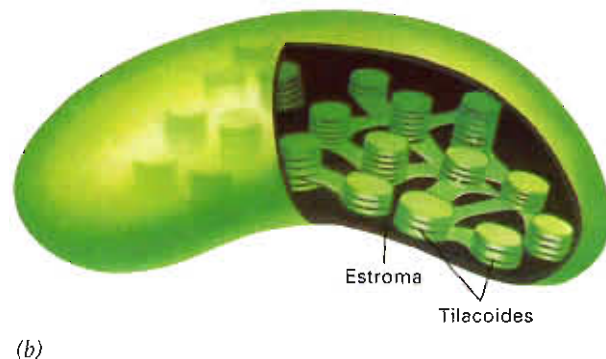
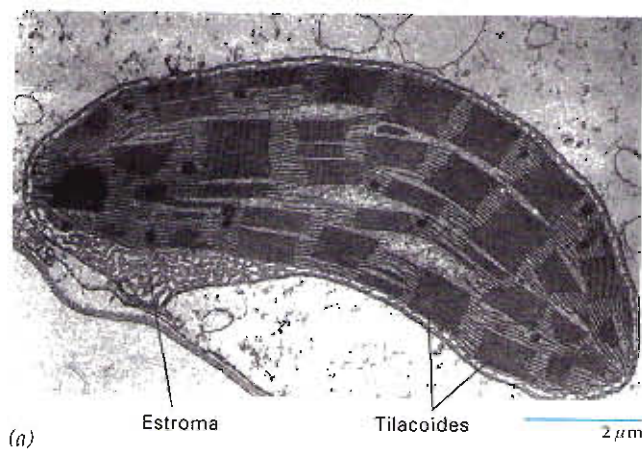


FIGURA 6-3. Estructura interna de un cloroplasto. *a)* Micrografía de transmisión electrónica a través de un solo cloroplasto. La membrana interna está dispuesta en pilas de tilacoides en forma de discos físicamente separados de la membrana externa. *b)* Esquema de un cloroplasto que muestra la doble membrana externa y la membrana tilacoide que se divide en tilacoides de los grana apilados y tilacoides del estroma no apilado (o laminillas de estroma). (*a*: Cortesía de Lester K. Shumway.)

na físicamente separado de la doble capa de la envoltura. La membrana interna del cloroplasto, que contiene el mecanismo transductor de energía, está organizada en sacos membranosos aplanados denominados **tilacoides**. Los tilacoides se disponen ordenadamente en unas estructuras llamadas **grana**, que recuerdan una pila de monedas (figs. 6-3 y 6-4). El tratamiento de cloroplastos aislados en un medio salino diluido dispersa los tilacoides que se reapijan cuando se incrementa la fuerza iónica del medio. El espacio dentro de un tilacoide es la **luz**, y el espacio fuera del tilacoide pero dentro de la envoltura externa se denomina **estroma**. Las cisternas membranosas aplanadas, llamadas **estroma tilacoide** (o **estroma laminar**), conectan algunos tilacoides de una grana con los de otra (fig. 6-4). La diferencia en estructura y función entre grana tilacoides y estroma tilacoide se analiza en *La vía experimental*, al final del capítulo.

Igual que la matriz de una mitocondria, el estroma de un cloroplasto contiene pequeñas moléculas circulares de DNA en doble cadena y ribosomas semejantes a los de células procariotas, que junto con algunas enzimas forman una reserva de información genética y el medio para utilizarla. Se estima que en las membranas tilacoides hay casi 60 polipéptidos diferentes relacionados con sistemas para conversión de energía, y casi la mitad están codificados en el DNA del cloroplasto.

Los lípidos que componen la membrana tilacoide son poco comunes porque contienen una cantidad relativamente escasa de fosfolípidos y un elevado porcentaje de glucolípidos neutros monogalactosil y digalactosil diacigliceroles. Los ácidos grasos de estos lípidos son aabrumadoramente insaturados y la bicapa de lípidos es muy fluida. Los cloroplastos son organelos semiautónomos, capaces de autoduplicarse, y se piensa que evolucionaron a partir de un procarionte fotosintético capaz de producir oxígeno (al parecer una cianobacteria) que adoptó una existencia simbiótica dentro de una célula huésped primitiva no fotosintética. Como resultado, los cloroplastos y las bacterias fotosintéticas

comparten muchas propiedades, incluyendo la presencia de porinas en las membranas externas, el tipo de DNA y de ribosomas en el estroma, y la naturaleza de su mecanismo fotosintético, que analizaremos en detalle en las siguientes páginas.

6-2 Revisión del metabolismo fotosintético

Uno de los mayores avances para entender las reacciones químicas de la fotosíntesis provino de una hipótesis pro-

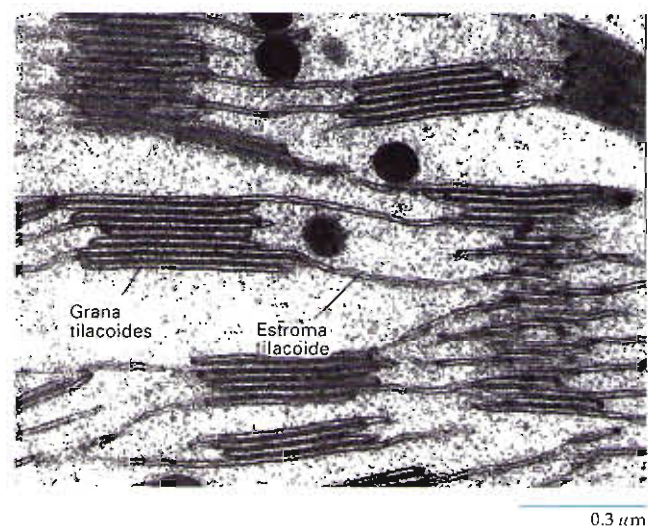
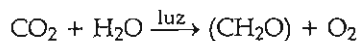
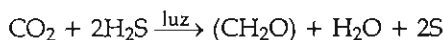


FIGURA 6-4. Membranas tilacoides. Micrografía electrónica de un corte a través de una porción de un cloroplasto de espinaca mostrando los grana tilacoides apilados y los estromas tilacoides no apilados. (Según L.A. Staehelin, en L.A. Staehelin, ed., *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. 19, p. 23, Springer-Verlag, 1986.)

puesta por C.B. van Niel a principios del decenio de 1930, quien entonces era estudiante graduado de la Universidad Stanford. Consideremos la ecuación total propuesta para la fotosíntesis:



En 1930, la idea prevaleciente era que la energía de la luz se empleaba para desdoblar el CO_2 , liberando oxígeno molecular (O_2) y transfiriendo el átomo de carbono a una molécula de agua para formar una unidad de carbohidrato (CH_2O). En 1931, van Niel propuso un esquema alterno basado en su trabajo con sulfobacterias. Se había demostrado de manera concluyente que estos organismos tenían capacidad para reducir CO_2 a carbohidratos empleando la energía de la luz sin producción simultánea de O_2 molecular. Se propuso que la reacción para la sulfobacteria era:



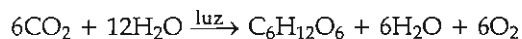
Reconociendo la semejanza básica en el proceso fotosintético de todos los organismos, van Niel propuso una reacción general para incluir todas estas actividades:



Para la producción de una hexosa, como la glucosa, la reacción sería



Van Niel reconoció que la fotosíntesis es un proceso esencialmente de oxidorreducción. En la reacción precedente, H_2A es un donador de electrones (agente reductor) y se puede representar por H_2O , H_2S , o algún otro sustrato reducido. Sin embargo, CO_2 es un agente oxidante, que en una célula vegetal se reduce para formar hexosa en la siguiente reacción:



En este esquema cada molécula de oxígeno se forma a partir del desdoblamiento de dos moléculas de H_2O , proceso causado por absorción de luz. El papel del agua en la formación de oxígeno molecular fue claramente establecido en 1941 por Samuel Ruben y Martin Kamen, de la Universidad de California, quienes efectuaron un experimento utilizando un isótopo de oxígeno ^{18}O especialmente marcado en vez del isótopo común ^{16}O . En su experimento marcaron un grupo de plantas con $\text{C}[^{18}\text{O}_2]$ y agua "regular", en tanto que otro grupo se marcó con dióxido de carbono "regular" y $\text{H}_2[^{18}\text{O}]$ marcado. Los investigadores plantearon una pregunta sencilla: ¿cuál de estos dos grupos de plantas libera $^{18}\text{O}_2$? Los resultados mostraron que las plantas con agua marcada produjeron oxígeno marcado, en tanto que las plantas con dióxido de carbono marcado produjeron oxígeno "regular". Contrario a lo que se pensaba, no es el dióxido de carbono el que se desdobla en sus dos elementos atómicos, sino el agua. La hipótesis de van Niel se había confirmado.

La proposición de van Niel colocó a la fotosíntesis en una perspectiva diferente; en esencia vino a ser lo inverso de la respiración. En la respiración, las mitocondrias reducen oxígeno para formar agua y en la fotosíntesis el cloroplasto oxida agua para formar oxígeno. En la figura 6-5 se

presenta un resumen total que contrasta la termodinámica de estas dos actividades metabólicas.

Los sucesos de la fotosíntesis se pueden dividir en dos series de reacciones. En la primera etapa, **reacciones dependientes de luz**, se absorbe energía de la luz solar para convertirla en energía química, la cual se almacena en el ATP y el NADPH. Durante la segunda etapa, **reacciones independientes de luz** (o "reacciones en la oscuridad"), se sintetizan carbohidratos a partir de dióxido de carbono empleando la energía almacenada en el ATP y el NADPH formado en las reacciones dependientes de luz. Se estima que cada año la vida vegetal sobre el planeta convierte aproximadamente 600 trillones de kilogramos de CO_2 en carbohidratos y libera casi 400 trillones de kilogramos de O_2 . La mayor parte de esta actividad se efectúa en el fitoplancton, una delgada y sensible capa de algas unicelulares vivientes que cubre los océanos del mundo cada vez más contaminados.

Iniciaremos nuestro análisis con las reacciones que dependen de luz, que son complejas y todavía incompletamente definidas.

6-3 Absorción de luz

La energía de la luz se transporta en paquetes llamados **fotones**. El contenido energético de un fotón depende de la longitud de onda de la luz según la ecuación

$$E = hv = \frac{hc}{\lambda}$$

donde h es la constante de Planck (1.58×10^{-34} cal · seg), v es la frecuencia de la radiación, c es la velocidad de la luz en el vacío y λ es la longitud de onda de la luz. Cuanto más corta sea la longitud de onda, mayor será el contenido de energía. Un mol (6.02×10^{23}) de fotones de luz roja (longitud de onda 635 nm) contiene aproximadamente 45 kcal de energía.

La absorción de luz es el primer paso en cualquier proceso fotoquímico. Cuando se absorbe un fotón, un electrón adquiere suficiente energía para pasar de un orbital interno a otro más externo. Se dice que la molécula ha cambiado de un **estado basal** a un **estado excitado**. Puesto que hay un número limitado de orbitales en los cuales puede existir un electrón y cada orbital tiene un nivel energético específico, se deduce que cualquier átomo o molécula sólo puede absorber luz de longitud de onda específica.

Una molécula en estado excitado es inestable y podría esperarse que sólo dure alrededor de 10^{-9} segundos. A un electrón excitado pueden ocurrirle varias cosas, según las circunstancias. Consideremos una molécula de **clorofila**, el pigmento fotosintético más importante que absorbe luz. Si el electrón de una molécula de clorofila excitada retorna a su orbital de menor energía, la energía absorbida debe liberarse. Si la energía de excitación se libera en forma de calor o de luz (fluorescencia), la clorofila ha retornado al estado basal original y la energía absorbida del fotón se desperdicia. Esto es precisamente lo que se observa cuando se ilumina una preparación de *clorofila aislada*: la solución emite una fluorescencia intensa debido a que la energía absorbida se

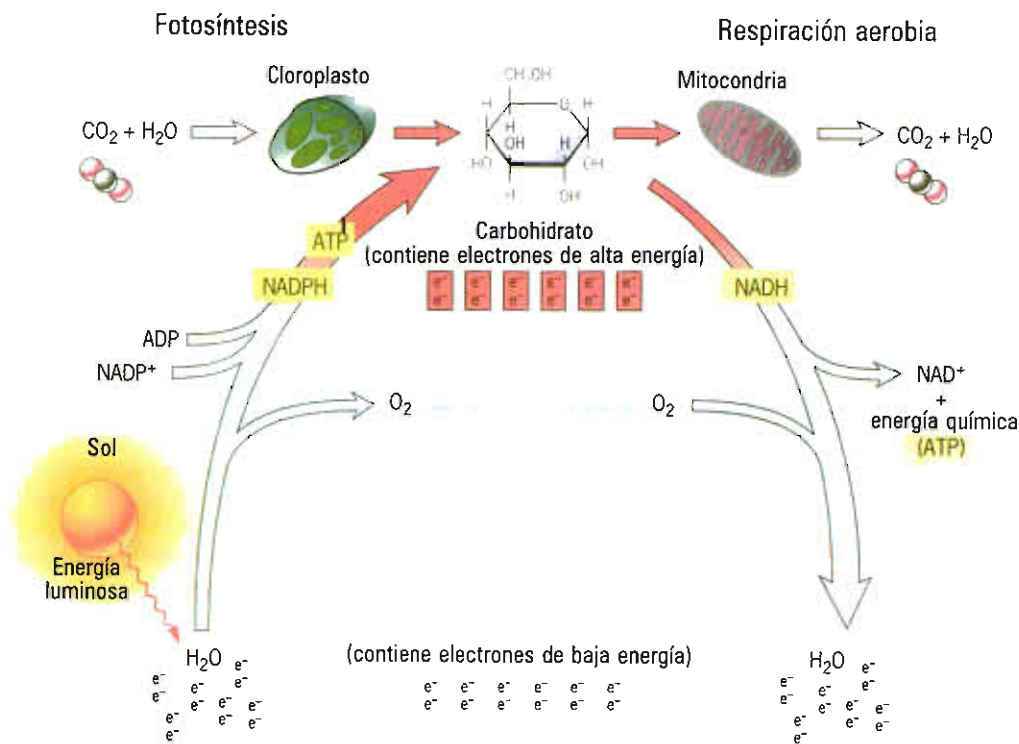


FIGURA 6-5. Comparación entre la energética total de la fotosíntesis y la respiración aerobia.

emite de nuevo con una longitud de onda más larga (o sea, menor energía). Sin embargo, si este mismo experimento se ejecuta con una preparación de *cloroplastos aislados*, sólo se observa una débil fluorescencia, lo que indica que se disipa muy poca de la energía absorbida. En vez de ello, los electrones energéticos son transferidos a aceptores antes que tengan oportunidad de retornar a sitios vacíos en los orbitales más internos de las moléculas de clorofila. Se estima que la transferencia del electrón puede ocurrir en menos de 10^{-12} segundos.

Pigmentos fotosintéticos

Los **pigmentos** son moléculas que contienen un **cromóforo**, grupo químico capaz de absorber luz de una longitud de onda particular del espectro visible. Las hojas de las plantas son verdes porque contienen gran cantidad del pigmento clorofila que absorbe luz con mayor intensidad entre el azul y el rojo y deja que las longitudes de onda verdes intermedias se reflejen a nuestros ojos. La estructura básica de la clorofila se muestra en la figura 6-6. Cada molécula consta de dos partes principales: 1) un anillo de porfirina cuya función es absorber luz, y 2) una cadena fitol hidrófoba (derivada de una unidad isoprenoide repetitiva, cuya estructura se muestra en la página 185) que mantiene la clorofila integrada al interior de la membrana fotosintética. A diferencia de las porfirinas rojas de la hemoglobina y la mioglobina que contienen hierro (grupos hem), la porfirina de la molécula de clorofila contiene un átomo de magnesio. Enla-

ces dobles y sencillos alternos a lo largo del borde del anillo de porfirina actúan deslocalizando electrones que forman una nube alrededor de dicho anillo (fig. 6-6). Sistemas conjugados de este tipo son fuertes absorbentes de luz, y dicha absorción es causa de una redistribución de la densidad de electrones en la molécula favoreciendo la pérdida de un electrón hacia un aceptor adecuado. Además, los sistemas de uniones conjugadas amplifican los picos de absorción causando que las moléculas individuales absorban intervalos de longitudes de onda. Estas características son evidentes en un **espectro de absorción** de moléculas purificadas de clorofila (fig. 6-7), que es una gráfica de la intensidad de la luz absorbida en relación con su longitud de onda. El intervalo de longitudes de onda que pueden absorber los pigmentos fotosintéticos situados dentro de la membrana tilacoide aumenta adicionalmente por la presencia de varios tipos de especies de pigmento (estudiadas en el siguiente párrafo), presencia de varios polipéptidos a los cuales se unen los pigmentos mediante enlaces no covalentes y diferencias locales en el entorno (fluidez, estado de agregación, etc.), en el cual residen los pigmentos.

Entre los organismos fotosintéticos (fig. 6-6) se encuentran varias clases de clorofila, que se distinguen entre sí por los grupos laterales unidos al anillo de porfirina. La clorofila *a* está presente en todos los organismos fotosintéticos productores de oxígeno, pero está ausente en las diferentes sulfobacterias. Además de la clorofila *a*, la clorofila *b* se encuentra en todas las plantas evolutivamente elevadas y en las algas verdes, y una tercera variedad, la clorofila *c*, ocurre en algas de color marrón, diatomeas y ciertos proto-

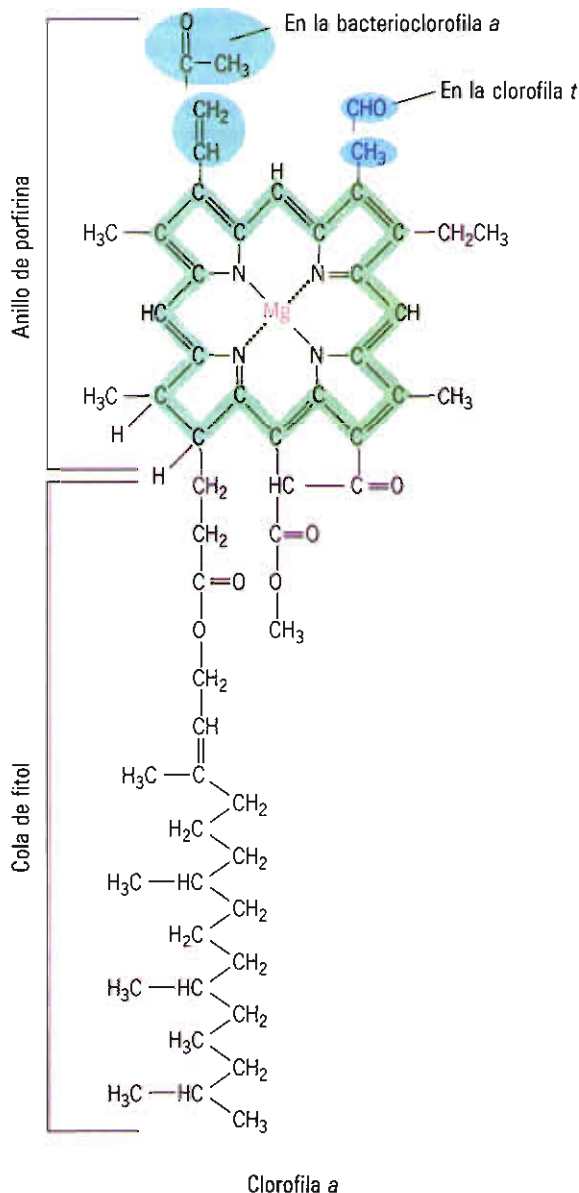
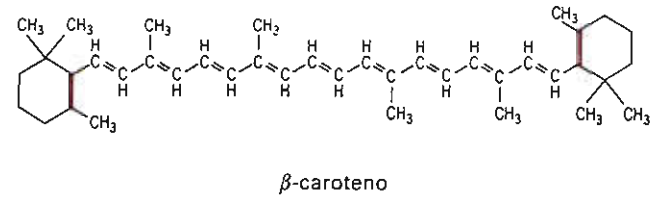


FIGURA 6-6. Estructura de la clorofila *a*. La molécula consta de un anillo de porfirina (a su vez formado por cuatro anillos pirrol más pequeños) con un ion magnesio en su centro y una larga cola hidrocarbonada. En la clorofila *b*, el grupo $-\text{CH}_3$ sobre el anillo II es reemplazado por un grupo $-\text{CHO}$. El área sombreada que rodea al borde de la porfirina indica la deslocalización de electrones para formar una nube. La estructura de la porfirina de la clorofila que contiene magnesio se puede comparar a la porfirina que contiene hierro de un grupo hem mostrado en la figura 5-12.

zoarios. La bacterioclorofila sólo se observa en bacterias verdes y púrpuras, organismos en los cuales la fotosíntesis no se acompaña de la formación de oxígeno.

Los pigmentos accesorios más importantes de la fotosíntesis en plantas evolutivamente elevadas son los carotenoides, por ejemplo el β -caroteno.



Los carotenoides absorben luz de longitudes de onda azul al verde (fig. 6-7). Las longitudes de onda amarillo, naranja y rojo son reflejadas por los carotenoides, lo que produce los colores característicos naranja y rojo de zanahorias, naranjas y hojas de algunas plantas durante el otoño. A medida que las hojas cesan de producir clorofila durante el frío clima invernal, los carotenoides dorados y rojos son más visibles; esto explica los brillantes y coloridos paisajes del otoño. La función más importante de los carotenoides puede ser proteger el mecanismo de fotosíntesis contra daños causados por especies reactivas de oxígeno, y no la de absorber luz para la fotosíntesis. Por ejemplo, células mutantes de algas que carecen de carotenoides no pueden sobrevivir en un ambiente aerobio debido a la destrucción mediada por oxígeno de su mecanismo de fotosíntesis.

La luz que incide sobre una hoja se compone de una gran variedad de longitudes de onda, por lo que la presencia de pigmentos con diferentes propiedades de absorción garantiza que un mayor porcentaje de los fotones incidentes tengan oportunidad de estimular la fotosíntesis. Esto se puede comprobar al examinar un **espectro de acción** (fig. 6-8), que es una gráfica de la eficiencia total de la fotosíntesis a diferentes longitudes de onda. Es importante la diferencia entre un espectro de acción y un espectro de absorción. El espectro de absorción mide las longitudes de onda capaces de suministrar la energía de transición apropiada para que una sustancia específica eleve los electrones a orbitales más altos, en tanto que el espectro de acción indica

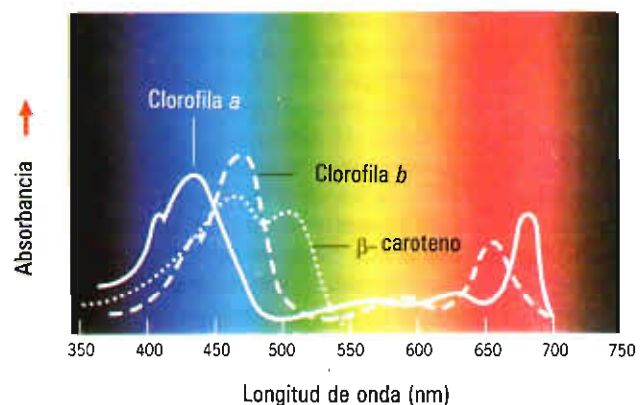


FIGURA 6-7. Espectro de absorción para varios pigmentos fotosintéticos de plantas evolutivamente avanzadas. El trasfondo muestra los colores percibidos para longitudes de onda del espectro visible. La clorofila absorbe con mayor intensidad en las regiones violeta-azul y rojo del espectro, en tanto que los carotenoides (o sea, beta-carotenos) absorben también en la región verde. Las algas rojas contienen pigmentos adicionales (ficobilinas) que absorben en las bandas intermedias del espectro.

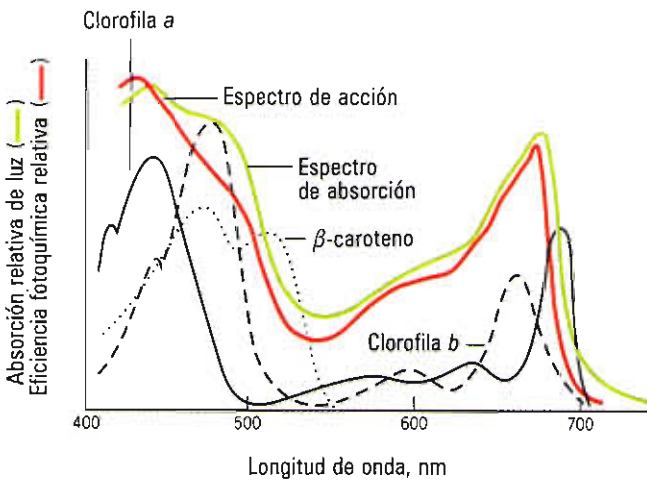


FIGURA 6-8. Espectro de acción para la fotosíntesis. El espectro de acción (representado por la línea de color rojo) indica la eficacia de la luz de diferente longitud de onda para promover la fotosíntesis en las hojas de una planta. Las líneas medias indican el espectro de absorción de cada uno de los principales pigmentos fotosintéticos. La línea verde muestra el espectro de absorción combinado de todos los pigmentos.

las longitudes de onda verdaderamente eficaces para efectuar una respuesta fisiológica determinada. El espectro de absorción para la fotosíntesis sigue bastante bien el patrón del espectro de absorción de clorofilas y carotenoides, lo que indica la importancia de estos pigmentos en la absorción de luz.

6-4 Unidades fotosintéticas y centros de reacción

En 1932, Robert Emerson y William Arnold, del California Institute of Technology, efectuaron un experimento que sugiere que no todas las moléculas de clorofila del cloroplasto participan activamente en la conversión de energía luminosa a energía química. Empleando suspensiones del alga *Chlorella* y luz intermitente de muy corta duración (p. ej., 10 μ seg) e intensidad de saturación, determinaron la cantidad mínima de luz necesaria para producir el máximo de oxígeno en un ciclo de fotosíntesis. Según el número de moléculas de clorofila presentes en la preparación, calcularon que durante un breve destello de luz se libera una molécula de oxígeno por cada 2 500 moléculas de clorofila presentes. Posteriormente se demostró que se absorbe un mínimo de ocho fotones (*quantum*) de luz para producir una molécula de O_2 ; por lo tanto, se puede concluir que los cloroplastos contienen aproximadamente 300 veces más moléculas de clorofila de lo que al parecer se requiere para la fotosíntesis.

Una posible interpretación de este dato es que sólo un pequeño porcentaje de las moléculas de clorofila participan en la fotosíntesis. Sin embargo, éste no es el caso. Más bien, las 300 moléculas de clorofila actúan juntas como una **unidad fotosintética** en la cual sólo un miembro del grupo, la

clorofila del centro de reacción, tiene realmente la capacidad de transferir electrones a un aceptor de los mismos. Aunque la masa de las moléculas del pigmento no participa directamente en la conversión de energía luminosa a energía química, todas se encargan de absorber luz; forman una especie de **antena**, un sistema para captar luz que atrapa fotones de diferentes longitudes de onda y transfiere esta energía de excitación con gran rapidez a la molécula del pigmento situada en el centro de reacción. El sistema antena no sólo incrementa la variedad de las longitudes de onda que pueden absorberse, sino también incrementa la eficiencia de la fotosíntesis. Se estima que incluso con luz brillante un fotón incidente golpea una molécula de pigmento a una frecuencia de casi una vez por segundo. En contraste, en el centro de reacción el pigmento tiene capacidad para transferir electrones a un aceptor adyacente con una frecuencia mayor de 200 por segundo. El agrupamiento de varios cientos de moléculas de pigmento captador de luz alrededor de un solo centro de reacción aumenta notablemente el número de electrones que el pigmento del centro de reacción puede transferir en una unidad de tiempo.

La transferencia de la energía de excitación de una molécula de pigmento a otra es muy sensible a la distancia entre las moléculas. La estrecha proximidad de los pigmentos se facilita gracias a su elevada concentración y su asociación a los polipéptidos de la membrana que los mantiene en posición fija, lo que favorece la transferencia de energía. Una "regla" importante que opera entre los pigmentos antena es que la energía de excitación nunca puede transferirse a una molécula que requiera mayor energía. En otras

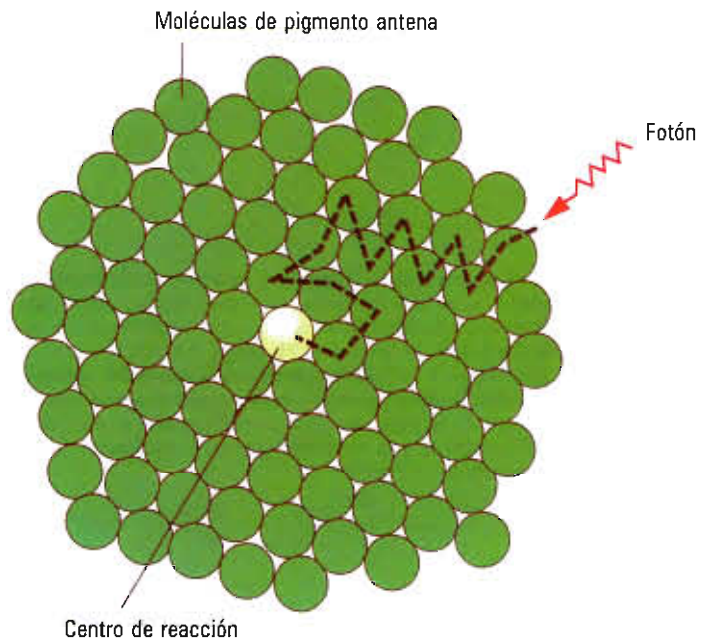


FIGURA 6-9. Transferencia de la energía de excitación. La energía de excitación se transfiere al azar a pigmentos que absorben luz de longitud de onda crecientemente mayor hasta que alcanza la clorofila del centro de reacción que transfiere un electrón excitado a un aceptor primario, como se describe posteriormente en el capítulo.

palabras, la energía de excitación no puede transmitirse a una molécula de pigmento que absorbe luz de longitud de onda más corta (mayor energía) que la absorbida por la molécula donadora. Por consiguiente, como la energía que pasa a través de una unidad fotosintética (fig. 6-9) cada vez se transfiere a una molécula de pigmento que absorbe una longitud de onda mayor, la naturaleza de las transferencias subsecuentes está muy restringida. La clorofila del centro de reacción es la única que tiene un pico máximo de absorción a la longitud de onda mayor, y por lo tanto actúa como una especie de “trampa” o “pozo” hacia el cual inevitablemente se dirigen todas las moléculas del pigmento antena captadoras de energía. La diferencia en el contenido de energía entre el fotón originalmente absorbido por un pigmento antena y la energía transferida finalmente al centro de reacción se libera en forma de calor. Se estima que la energía de excitación tarda unos 200×10^{-12} segundos en viajar desde el sitio de absorción hasta el centro de reacción del pigmento. Una vez que la energía es recibida en el centro de reacción, el electrón excitado puede transferirse al aceptor “en espera”.

Evolución del oxígeno: coordinación de la actividad de dos sistemas fotosintéticos diferentes

La evolución de organismos capaces de utilizar H_2O como fuente de electrones requirió innovaciones en el mecanismo de fotosíntesis, razón por lo cual puede entenderse si se considera la energética de la fotosíntesis oxigénica (liberadora de O_2). El par O_2 - H_2O tiene un potencial redox estándar de +0.82 V, en tanto que el del par $NADP^+$ - $NADPH$ es -0.32 V. La diferencia entre estos dos valores (1.14 V, que equivale a 52.6 kcal/mol) proporciona una medida de la energía que debe suministrarse a un par de electrones para eliminarlos de H_2O y pasarlos a $NADP^+$ en condiciones estándar. Un fotón de luz roja no contiene suficiente energía para elevar un electrón al nivel energético requerido (pág. 211). Este problema se resolvió con la evolución de dos diferentes reacciones fotoquímicas que ocurren en dos fotosistemas espacialmente separados.

Cada fotosistema es “responsable” de impulsar los electrones una parte del camino sobre la cuesta energética (fig. 6-10), de manera no muy diferente a como una silla elevadora de dos pasos levanta a los esquiadores para pasar un plano inclinado particularmente largo. Un fotosistema, denominado **fotosistema II (PSII)**, impulsa los electrones desde un nivel energético menor que el del agua en el extremo de baja energía hasta un punto a mitad del camino donde el otro fotosistema, denominado **fotosistema I (PSI)**, eleva los electrones hasta un nivel energético por arriba de $NADP^+$. Se dice que los dos fotosistemas actúan en serie, o sea, uno después del otro.

El centro de reacción del fotosistema II se denomina **P680**: “P” por “pigmento” y “680” por la longitud de onda de la luz que la molécula de clorofila absorbe con mayor intensidad. El centro de reacción del fotosistema I se denomina **P700** por razones similares. Cuando la luz del sol incide sobre la membrana tilacoide, se absorbe energía simul-

táneamente en los pigmentos antena de ambos PSII y PSI, y pasa a los centros de reacción de ambos fotosistemas. Los electrones de los pigmentos de ambos centros de reacción son impulsados a un orbital más externo y cada electrón fotoexcitado es transferido a un **aceptor primario de electrones**. La transferencia de electrones afuera de los fotosistemas deja los pigmentos de los dos centros de reacción con un electrón menos, y por lo tanto con carga positiva. Luego de perder sus electrones, los centros de reacción de PSII y PSI se pueden denominar **P680⁺** y **P700⁺**, respectivamente. Los centros de reacción positivamente cargados atraen electrones, lo que establece la etapa de flujo de electrones entre transportadores. En la fotosíntesis oxigénica, donde actúan dos fotosistemas en serie, el flujo de electrones ocurre a lo largo de tres ramas: entre agua y PSII, entre PSII y PSI, y entre PSI y $NADP^+$, disposición descrita como **esquema Z**. En la figura 6-10 se muestra una amplia representación del esquema Z; explicaremos el nombre de los diferentes componentes conforme examinemos por separado cada una de las principales partes de la vía.

Operaciones PSII: obtención de electrones por separación de agua

PSII es un complejo de más de 20 polipéptidos diferentes, la mayor parte codificados por el genoma del cloroplasto de una célula vegetal. Nuestra comprensión de los sucesos que ocurren en los centros de reacción PSII recibió un gran impulso en el decenio pasado cuando se comprobó que PSII posee estructura y función muy similares a un centro de reacción fotosintético (CRF) de la bacteria púrpura no sulfurosa *Rhodospseudomonas viridis*. A mediados de los años 1980, Johann Deisenhofer, Robert Huber y Helmut Michel, del Max Planck Institute de Alemania, describieron la estructura del CRF bacteriano a nivel de resolución atómica. Estos datos suministraron la primera imagen tridimensional de una proteína de membrana (o complejo proteínico de membrana) en la forma que reside dentro de la bicapa del lípido de una membrana celular (fig. 6-11, a). El CRF de esta bacteria púrpura contiene dos proteínas hidrófobas, denominadas **subunidad L** y **subunidad M**, unidas a varios pigmentos y centros redox (indicados en color en la figura 6-11, a, y mostradas por separado de la proteína en la figura 6-11, b). Los centros redox se requieren para absorber luz y transferir electrones lejos de los pigmentos de los centros de reacción, como se describe en el pie de figura. En vez de analizar el mecanismo que emplea esta bacteria retornaremos al fotosistema II, que efectúa una serie similar de reacciones con una excepción importante: los sucesos en PSII dan como resultado la separación del agua.

Una vez obtenida la secuencia de las subunidades L y M del centro del CRF bacteriano se determinó su estructura tridimensional, comprobándose que el PSII de la cianobacteria y de plantas evolutivamente elevadas contiene dos proteínas pequeñas, denominadas **D1** y **D2** (fig. 6-12, a), cuya secuencia de aminoácidos mostró notable homología con las dos subunidades bacterianas. Estudios subsecuentes demostraron que D1 y D2 se-enlazan a la molécula de clorofila P680 y a los centros redox del fotosistema para efectuar las complejas actividades fotoquímicas requeridas para oxidar el agua.

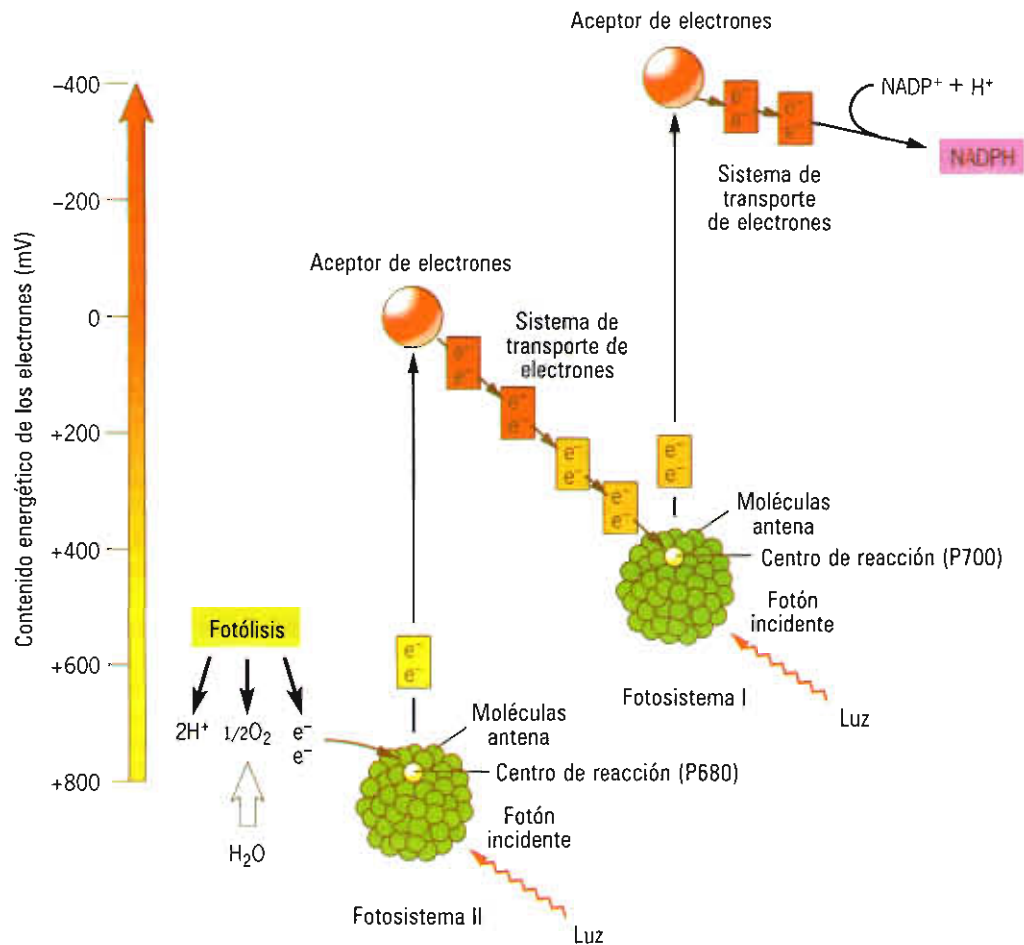


FIGURA 6-10. Panorama del flujo de electrones durante las reacciones fotodependientes de la fotosíntesis. Los sucesos mostrados en este esquema se describen en detalle en las siguientes páginas. Los diferentes portadores implicados en el transporte de electrones para la fotosíntesis se indican en la figura 6-18.

Recolección de luz. El primer paso en la activación de PSII es la absorción de luz por un pigmento antena. La mayor parte de los pigmentos antena que recolectan luz para PSII residen en un complejo pigmento-proteína separado, denominado **complejo II captador de luz**, o simplemente **LHCII**, el cual puede situarse fuera del propio fotosistema (fig. 6-12, *a*). Se ha aislado LHCII de cloroplastos de plantas de guisantes en forma de un trímero que consta de tres polipéptidos integrales de membrana (fig. 6-12, *a*). Cada polipéptido mantiene enlaces no covalentes que lo unen a casi 12 moléculas de clorofila (7 moléculas de clorofila *a* y 5 moléculas de clorofila *b*; fig. 6-12, *b*) y dos carotenoides (mostrados en amarillo en la figura 6-12, *b*). Las clorofilas cuelgan de las hélices del polipéptido a dos niveles diferentes respecto de la bicapa de lípidos; por esta razón, la disposición de las clorofilas se compara con ropa colgada al aire para secar en dos cuerdas a diferente nivel. Los carotenoides protegen el complejo de las especies reactivas de oxígeno.

Los pigmentos de LHC se encuentran en estrecho contacto entre sí, facilitando la rápida transferencia de energía

hacia el centro de reacción. Los complejos LHCII son muy abundantes en las membranas tilacoides; se estima que casi 50% de todas las moléculas de clorofila sobre el planeta están presentes como parte de un complejo LHCII. Según se analiza en *La vía experimental* al final del capítulo, LHCII no siempre se une a PSII, y en condiciones apropiadas puede desplazarse a través de la membrana tilacoide y unirse a PSI sirviendo como complejo captador de luz para el centro de reacción PSI.

Transferencia de electrones dentro de PSII. La energía de excitación se transfiere de LHCII a un complejo antena interno situado en el plano central de la membrana y que consta de proteínas íntimamente unidas a clorofila relacionadas con el centro de reacción PSII. En la figura 6-13 se ilustra la secuencia de acontecimientos que ocurren en el centro de reacción. Cuando se transfiere la energía de los pigmentos antena centrales a P680, los pigmentos del centro de reacción responden (en unos 3 a 4 picosegundos) transfiriendo un electrón fotoexcitado a una molécula de feofitina, semejante a clorofila, con la que están íntimamente relacionados (paso 1, fig. 6-13), que es el aceptor primario

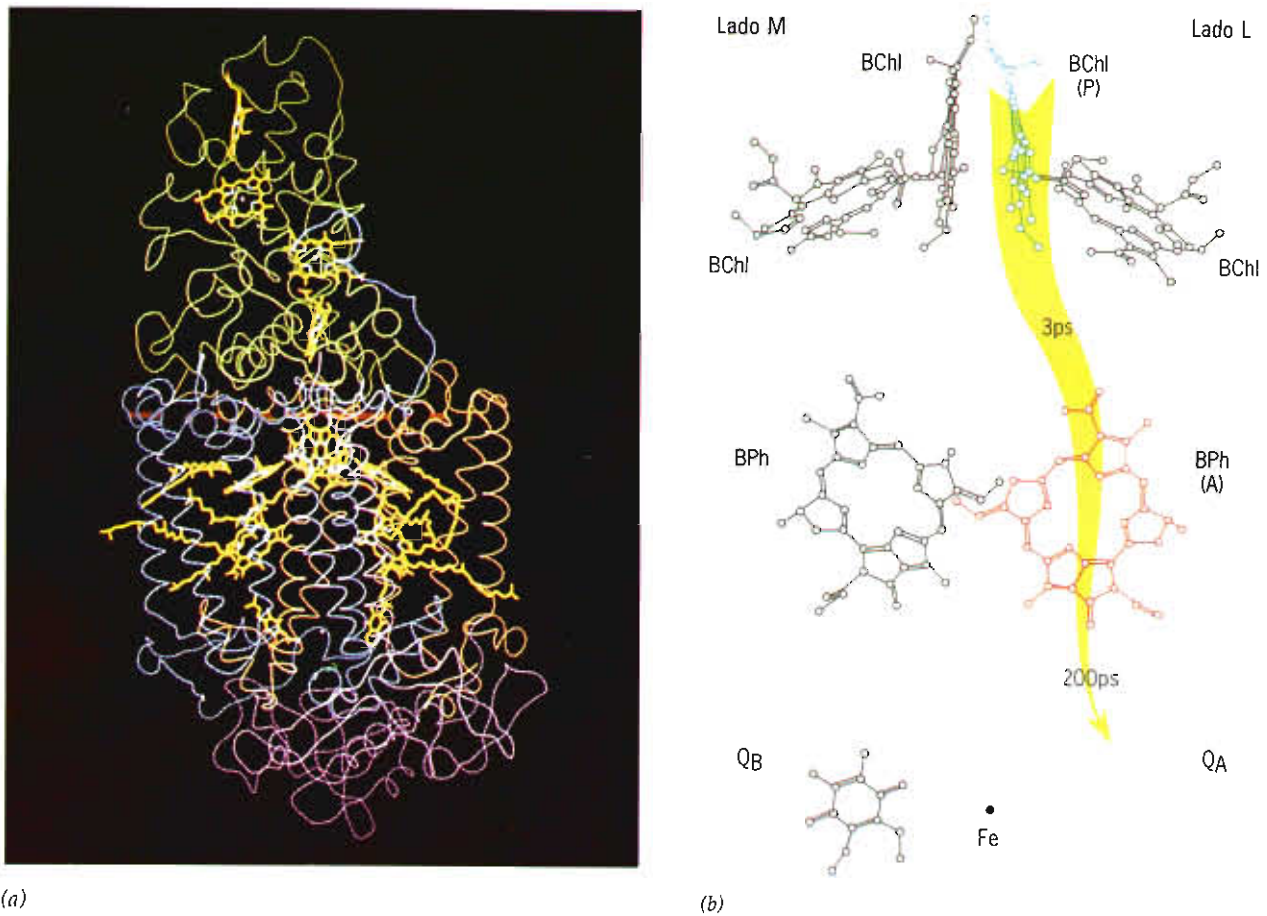


FIGURA 6-11. Estructura del centro de reacción fotosintético de *R. viridis*. a) Las cadenas de proteínas se representan por trazos de esqueletos lisos: el citocromo se muestra en verde, la subunidad M en azul, la subunidad L en marrón y la subunidad H en púrpura. Los átomos de los cofactores redox se dibujan en colores brillantes: carbonos en amarillo, nitrógenos en azul, oxígenos en rojo, magnesio en verde. b) La vía que siguen los electrones a través del centro de reacción de *R. viridis* está indicada por la flecha ancha de color amarillo. Aunque hay dos conjuntos de cofactores, la transferencia de electrones es muy asimétrica y ocurre casi exclusivamente a lo largo de la rama L mostrada a la derecha. Durante la fotosíntesis, una molécula del pigmento (P) de bacterioclorigofila absorbe la luz (molécula azul en la parte superior), que responde transfiriendo un electrón excitado a un aceptor cercano (A) provocando la formación de un donador de electrones con carga positiva (P^+) y un aceptor de electrones con carga negativa (A^-). En *R. viridis*, A es la bacteriofeofitina (molécula roja), una molécula parecida a la clorofila que carece de ion Mg^{2+} . P^+ es deficiente en electrones y busca electrones; o sea, es un agente oxidante. Por lo contrario, A^- tiene un electrón extra que puede perder con facilidad; o sea, es un agente reductor. Puesto que las especies con carga positiva y negativa muestran una atracción mutua evidente, es esencial estabilizar las dos cargas separadas. La estabilización se logra transfiriendo electrones a una molécula de quinona (Q_A , molécula púrpura) situada en un punto lejano de la bacterioclorigofila original. Los electrones excitados pasan subsecuentemente a la ubiquinona (UQ) para formar un UQH_2 , que es un fuerte agente reductor. Por último, los electrones fluyen de un UQH_2 de nuevo al pigmento del centro de reacción deficiente de electrones generando un gradiente de protones a través de la membrana que se emplea en la síntesis de ATP. ps = piconsegundo. (a: Según Johann Deisenhofer y Helmut Michel, EMBO J. 8:2154, 1989, con permiso de Oxford University Press.)

de electrones. Esta transferencia de un electrón genera un donador con carga positiva ($P680^+$) y un aceptor con carga negativa (Feo^-). La importancia de la formación de dos especies con carga opuesta, $P680^+$ y Feo^- puede ser más evidente si consideramos la capacidad de oxidorreducción de estas dos especies. $P680^+$ es deficiente en electrones y anda en busca de ellos, convirtiéndose así en un agente oxidante. En contraste, Feo^- tiene un electrón extra que puede perder con facilidad y por lo tanto es un agente reductor. Este hecho, la formación de un agente oxidante y un agente reductor operado por la luz, que tarda menos de una milmillonésima de segundo, es la esencia de la fotosíntesis.

$P680^+$ es un agente oxidante fuerte, en tanto que Feo^- es un agente reductor débil. Se estima que el potencial redox de la forma oxidada de $P680$ es alrededor de +1.1 V, lo bastante fuerte para atraer con gran intensidad (baja energía) a los electrones del agua (potencial redox de +0.82 V) y separar la molécula. La separación del agua durante la fotosíntesis se denomina **fotoólisis**.

Debido a su carga opuesta, $P680^+$ y Feo^- muestran notable atracción mutua. Igual que en el CRF bacteriano ilustrado en la figura 6-11, la separación de cargas se estabiliza separando cargas que finalmente quedan en lados opuestos de la membrana. En PSII, Feo^- transfiere su electrón

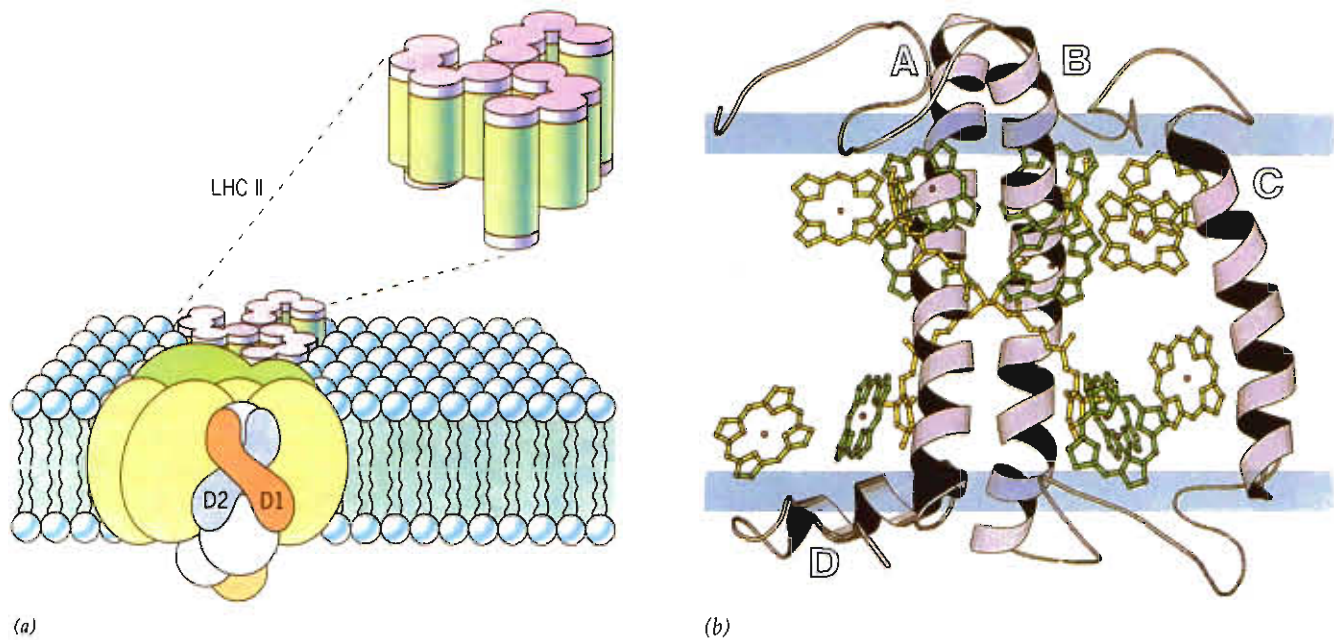


FIGURA 6-12. Organización molecular del fotosistema II. a) El fotosistema II consta de varios polipéptidos, incluyendo D1 y D2, unidos a la clorofila del centro de reacción y los componentes redox relacionados. El centro de reacción está rodeado por complejos captadores de luz (LHCII) cuya estructura trimérica se muestra en el recuadro. b) Vista lateral del monómero LHCII en la forma que reside dentro de la bicapa de lípidos (indicada por las bandas azules). El monómero contiene tres hélices alfa que rodean a toda la membrana, marcadas A, B y C, además de 12 moléculas de clorofila. Las porfirinas de la clorofila están dispuestas en dos niveles, correspondiendo regularmente a las dos hojas de la bicapa (clorofila *a*, verde oscuro; clorofila *b*, verde claro; carotenoides, amarillo; átomos de magnesio, esferas de color rosa). (a: Según G. Renger, en *Topics in Photosynthesis*, J. Barber, ed., vol. 11, Elsevier, 1992; b: reimpresso con autorización de Werner Kühlbrandt, Da Neng Wang y Yoshinori Fujiyoshi, *Nature* 367:618, 1994, copyright 1994, Macmillan Magazines Ltd.)

(paso 2, fig. 6-13) a una molécula de plastoquinona (designada Q_A) enlazada a la proteína D1 en el lado externo (del estroma) de la membrana. La plastoquinona (PQ) es una molécula liposoluble (fig. 6-14) de estructura similar a la ubiquinona (fig. 5-12, c). El electrón de la plastoquinona Q_A se transfiere (paso 3, fig. 6-13) a una segunda plastoquinona (designada Q_B), generando una forma semirreducida de la molécula ($Q_B^{\bullet -}$) que permanece firmemente enlazada a la proteína D1 del centro de reacción. Con cada una de estas transferencias, los electrones se aproximan cada vez más al lado del estroma de la membrana.

Conforme ocurren los acontecimientos descritos antes, el agujero del electrón en el pigmento con carga positiva ($P680^+$) se llena mediante la transferencia de un electrón (paso A, fig. 6-13) procedente de un residuo específico de tirosina (designado Tir_z) de la proteína D1, formando Tir_z^+ y $P680$ neutro. A su vez, Tir_z^+ se reduce al aceptar electrones suministrados por el agua (paso B, fig. 6-13), según analizaremos más adelante.

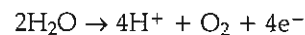
La absorción de un segundo fotón por $P680$ envía un segundo electrón a lo largo de la vía, de feofitina a Q_A , a $Q_B^{\bullet -}$ para formar Q_B^{2-} (paso 4, fig. 6-13), que se combina con dos protones para formar Q_BH_2 (PQH_2) (paso 5, figs. 6-13 y 6-14). Los protones empleados en la formación de PQH_2 se derivan del estroma, lo que provoca disminución de la concentración de H^+ del estroma (elevación de su pH). La molécula PQH_2 reducida se disocia de la proteína y es sus-

tituida por una nueva molécula Q_B recién oxidada procedente de la reserva de plastoquinona de la bicapa (paso 6, fig. 6-13). En la siguiente sección seguiremos el destino de los electrones (y protones) transportados por PQH_2 .

Flujo de electrones del agua a PSII

La parte menos conocida de toda la cadena que se extiende desde el agua hasta $NADP^+$ es el primer segmento entre H_2O y PSII. El desdoblamiento del agua es altamente endergónico debido a la asociación estable del hidrógeno con los átomos de oxígeno. Consideremos que en el laboratorio el desdoblamiento del agua requiere el empleo de una fuerte corriente eléctrica o temperaturas que se aproximan a $2\,000^\circ\text{C}$. Aun así, una célula vegetal puede efectuar esta hazaña en una montaña nevada utilizando la pequeña cantidad de energía procedente de la luz visible.

Se cree que la formación de una molécula de oxígeno durante la fotólisis requiere la pérdida *simultánea* de cuatro electrones procedentes de dos moléculas de agua, según la reacción



Incluso un centro de reacción PSII sólo puede generar a la vez una carga positiva ($P680^+$), o un equivalente oxidante. En PSII se asocian cuatro iones manganeso (Mn) (fig. 6-13) que desempeñan un papel vital en la formación de oxígeno. Los cuatro iones reunidos acumulan cuatro cargas positi-

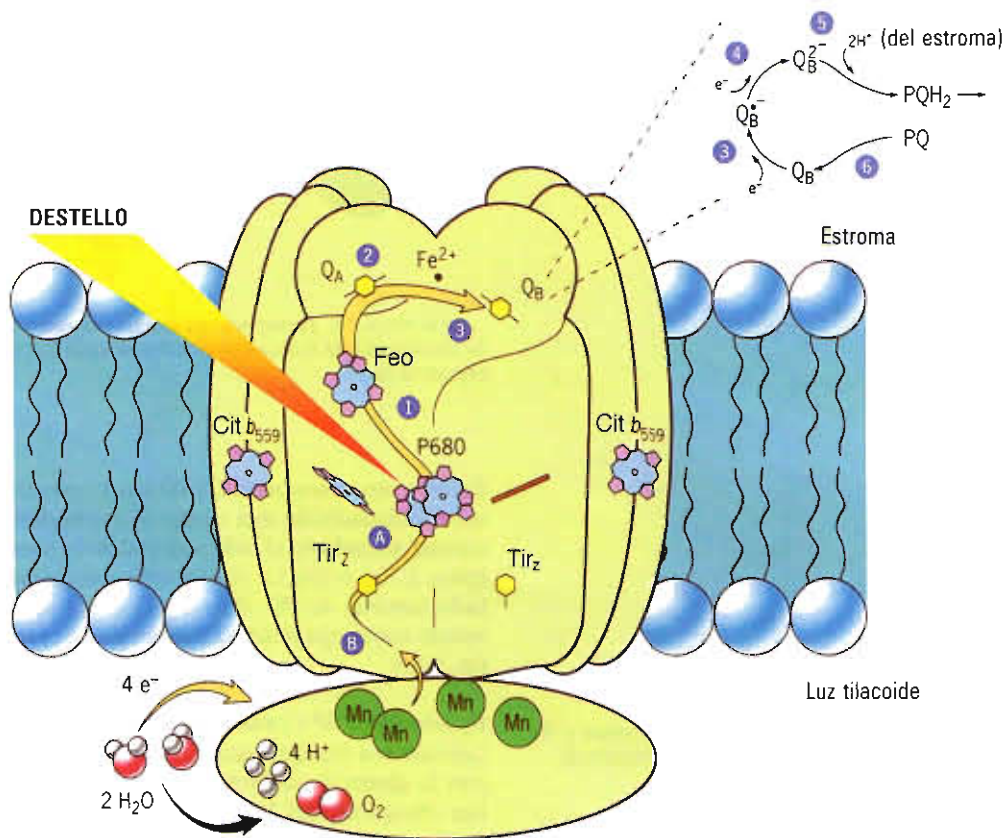
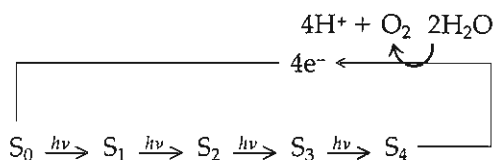


FIGURA 6-13. Organización funcional del fotosistema II. El dibujo muestra un modelo estructural de PSII, incluyendo los principales componentes redox que se analizan en el texto. La vía que siguen los electrones está indicada por la flecha amarilla. Los acontecimientos comienzan con la absorción de luz por P680, lo que provoca la excitación de un electrón y su transferencia (paso 1) a la feofitina (Feo), aceptor primario de electrones de PSII. Subsecuentemente, el electrón pasa a QA (fase dos) y luego a QB (paso tres) para formar un radical libre con carga negativa (QB⁻). La absorción de un segundo fotón envía un segundo electrón a lo largo de la misma vía convirtiendo en aceptor a QB⁻ (paso cuatro). A continuación entran dos protones del estroma (paso cinco) generando QBH₂ (que en realidad es plastoquinona reducida, PQH₂), la cual se libera en la bicapa de lípidos y es sustituida por una nueva molécula QB oxidada (paso seis). Conforme ocurren los sucesos anteriores, los electrones se desplazan desde H₂O por la vía Tir₂ al pigmento del centro de reacción con carga positiva (pasos B y A).

vas sucesivas que en el estado de oxidación proceden desde 0 hasta +4. El grupo Mn alcanza el estado de oxidación +4 (o S₄) transfiriendo cuatro electrones, uno a la vez, al P680⁺ cercano (vía Tir₂⁺). Después de transferir cada electrón a P680⁺ para regenerar P680, el pigmento vuelve a oxidarse (regresando a P680⁺) luego de absorber otro fotón. Por lo tanto, la acumulación de cuatro cargas positivas (equivalentes oxidantes) en el grupo Mn se efectúa gracias a la absorción sucesiva de cuatro fotones en el centro de reacción PSII. Una vez logrado esto, el oxígeno liberado en el complejo PSII puede catalizar la eliminación de 4e⁻ de las moléculas 2H₂O, generando un O₂ y regenerando al grupo Mn completamente reducido (estado S₀). Este proceso se puede escribir como



La reacción requiere la presencia de iones cloro y iones calcio; la razón de estos cofactores todavía no es clara.

Los protones producidos en la reacción de fotólisis se desplazan a la luz del tilacoide donde contribuyen al gradiente de protones. La demostración de la acumulación de equivalentes oxidantes sucesivos se obtuvo por primera vez exponiendo células de algas a destellos muy breves de luz (1 μseg). Después de 1 o 2 destellos prácticamente no se libera oxígeno. Las células deben iluminarse varias veces para que detecten una cantidad cuantificable de O₂, lo que indica que para liberar O₂ debe acumularse el efecto de fotorreacciones individuales (fig. 6-15).

De PSII a PSI

Anteriormente se describió cómo la absorción de dos fotones sucesivos en el centro de reacción PSII conduce a la formación de una molécula de plastoquinona totalmente reducida (PQH₂) que se libera en el interior de la reserva de PQ en la bicapa de lípidos. PQH₂ es un transportador de electrones móviles cuya estructura y función es similar

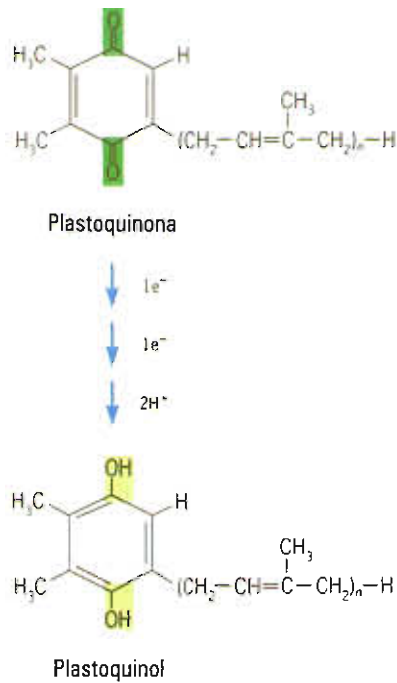


FIGURA 6-14. Plastoquinona. La aceptación de dos electrones y de dos protones reduce PQ (plastoquinona) a PQH₂ (plastoquinol).

a UQH₂ de la cadena respiratoria de las mitocondrias (pág. 184). Durante la fotosíntesis, los electrones procedentes de PQH₂ se transfieren a un complejo multiproteínico denominado *citocromo b₆f* (paso 1, fig. 6-16), en tanto que los protones se liberan en el interior de la luz tilacoide (paso 2, fig. 6-16). Puesto que estos protones originalmente se derivan del estroma, su liberación en la luz constituye una translocación de protones a través de la membrana tilacoide (fig. 6-18). Los electrones procedentes del citocromo *b₆f* se trans-

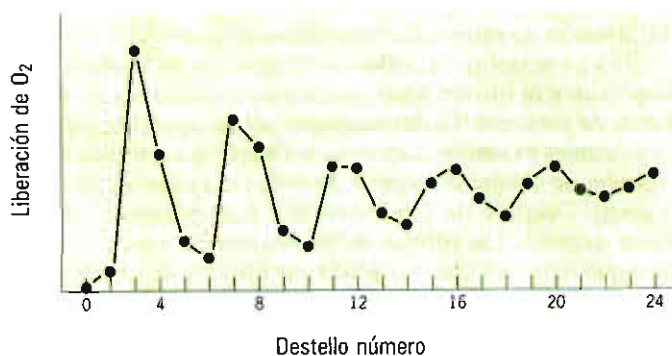


FIGURA 6-15. Medición de la cinética de liberación de O₂. La gráfica muestra la respuesta de cloroplastos aislados que se mantuvieron en la oscuridad a destellos sucesivos de muy breve duración. La cantidad de oxígeno liberada es máxima cada cuatro destellos de luz. El primer máximo ocurre después de tres destellos (en vez de cuatro) debido a que la mayor parte de las proteínas que contienen manganeso se presentan en el estado M¹⁺ cuando se mantienen en la oscuridad.

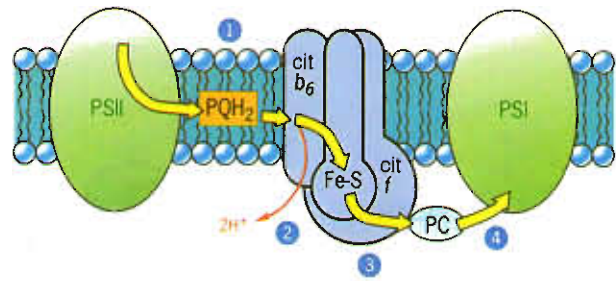


FIGURA 6-16. Transporte de electrones entre PSII y PSI. El flujo de electrones está indicado por la flecha amarilla. Los pasos se describen en el texto.

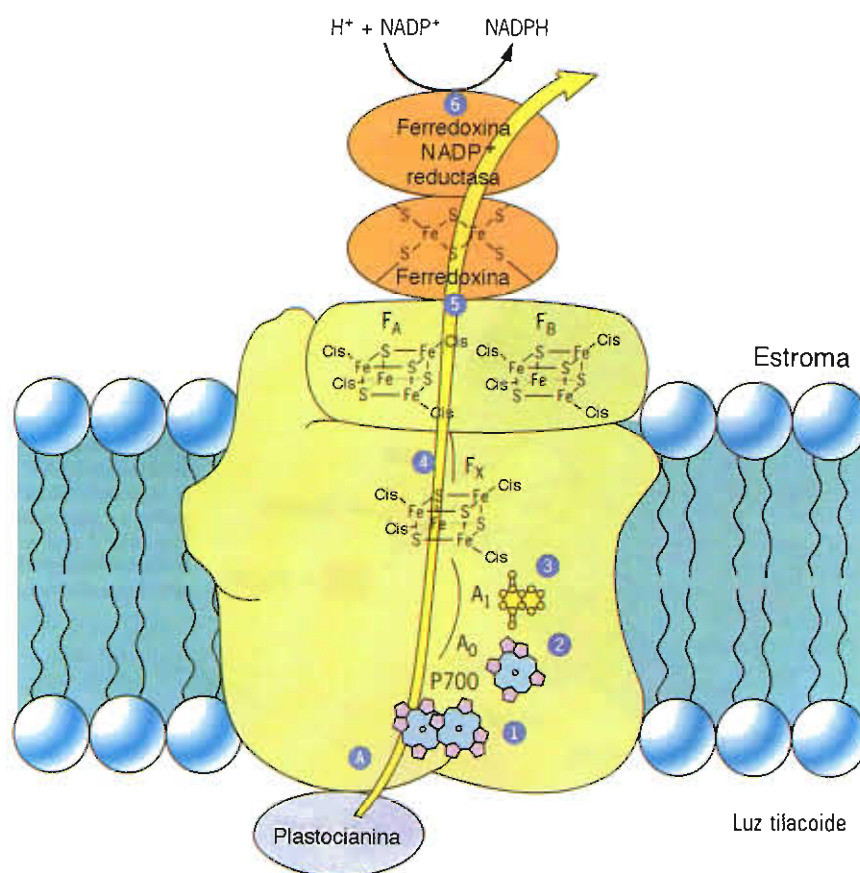
fieren a otro transportador de electrones móviles, una proteína hidrosoluble que contiene cobre denominada *plastocianina*, situada en el lado luminal de la membrana tilacoide (paso 3, fig. 6-16). La plastocianina transporta electrones al lado luminal de PSI, donde se transfieren a P700⁺, el pigmento con carga positiva del centro de reacción PSI (paso 4, fig. 6-16).

Operación PSI y reducción de NADP⁺

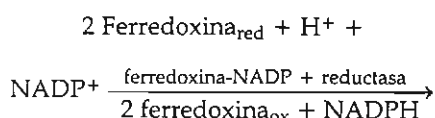
Los sucesos fotoquímicos que tienen lugar en PSI se inician con la absorción de fotones por un complejo captador de luz (denominado **LHCI**) que contiene moléculas antena de clorofila formando un complejo de varios polipéptidos diferentes. La energía de la excitación pasa de los pigmentos antena al centro de reacción PSI, una multiproteína compleja grande que contiene varios centros redox diferentes (fig. 6-17). El pigmento del centro de reacción es una molécula de clorofila *a*, P700, que al aceptar la energía de la excitación se convierte en P700⁺ oxidado. La oxidación del pigmento ocurre conforme se transfiere un electrón a una segunda molécula de clorofila *a* (designada A₀), que actúa como aceptor primario de electrones (paso 1, fig. 6-17). La separación de cargas en PSI que acompaña a la absorción de un fotón da como resultado la formación de un agente oxidante débil (P700⁺) y un agente reductor fuerte (A₀⁻). El agente reductor formado en PSI debe tener un potencial redox suficientemente negativo (estimado en -0.7 V) capaz de reducir NADP⁺ (potencial redox de -0.324 V).

La separación inicial de cargas se estabiliza por la transferencia del electrón de A₀⁻ a través de varias "manos", incluyendo un tipo de quinona denominado *filoquinona* (designado A₁) y tres centros de hierro y azufre (designados F_X, F_B y F_A), todos formando parte del centro de reacción PSI (pasos 2-4, fig. 6-17). La formación de P700⁺ ocurre en el lado luminal de la membrana y el electrón que pierde el aceptor primario pasa a través de la membrana hasta los centros de hierro y azufre del lado del estroma. A continuación, el electrón se transfiere a una pequeña proteína periférica de hierro y azufre denominada *ferredoxina* (paso 5, fig. 6-17). De la *ferredoxina*, el electrón pasa al NADP⁺ junto con un protón, formando NADPH (paso 6, fig. 6-17). Esta reacción es catalizada por una enzima grande denominada *ferredoxina-NADP⁺ reductasa* (FNR). Puesto que necesita dos electrones para formar NADPH y una molécula indivi-

FIGURA 6-17. Organización funcional del fotosistema I. El dibujo muestra un modelo estructural de PSI, incluyendo los principales componentes redox analizados en el texto. Los sucesos se inician con la absorción de luz por P700, lo que provoca la excitación de un electrón y su transferencia (paso uno) a A_0 , el aceptor primario de electrones de PSI. Posteriormente el electrón pasa a A_1 (paso dos) y luego a un centro de hierro y azufre denominado F_X (paso tres) y después a través de dos centros más de hierro y azufre (F_A y F_B), y por último a la ferredoxina, una proteína pequeña de hierro y azufre (paso cinco). Cuando dos moléculas diferentes de ferredoxina han aceptado un electrón, actúan juntas para reducir una molécula $NADP^+$ a $NADPH$ (paso seis). El pigmento deficiente en electrones se reduce por medio de un electrón donado por plastocianina (paso 4).



dual de ferredoxina sólo puede aceptar un electrón, durante la reducción deben actuar juntas dos ferredoxinas:



La eliminación de un protón del estroma aumenta el gradiente de protones a través de la membrana tilacoide.

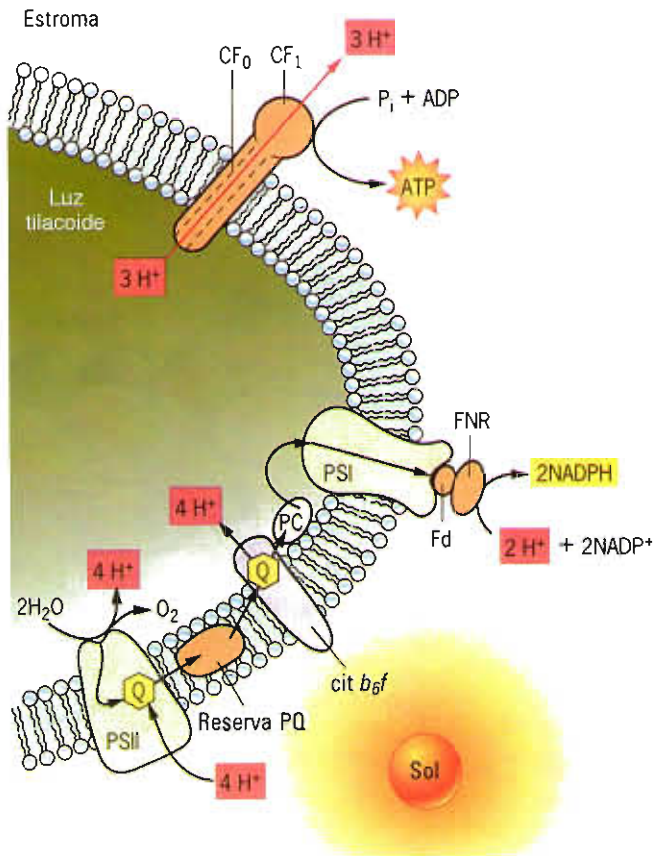
No todos los electrones que pasan a la ferredoxina terminan inevitablemente en $NADPH$; pueden tomar rutas alternas, según el organismo particular y las condiciones del momento. Por ejemplo, los electrones procedentes de PSI pueden pasar a varios aceptores inorgánicos, que por lo tanto se reducen. Estas vías para electrones a veces conducen a la reducción final de nitrato (NO_3^-) a amonio (NH_3) o de sulfato (SO_4^{2-}) a sulfhidrilo ($-\text{SH}$), reacciones que convierten “desperdicios” inorgánicos en compuestos necesarios para la vida. Por lo tanto, la energía de la luz solar se emplea no sólo para reducir los átomos de carbono más oxidados (del CO_2), sino también para reducir formas altamente oxidadas de nitrógeno y también átomos de azufre.

Si reconsideramos todo el proceso de transporte de electrones que tiene lugar durante la fotosíntesis oxigénica (resumida en la figura 6-18), podemos observar que los elec-

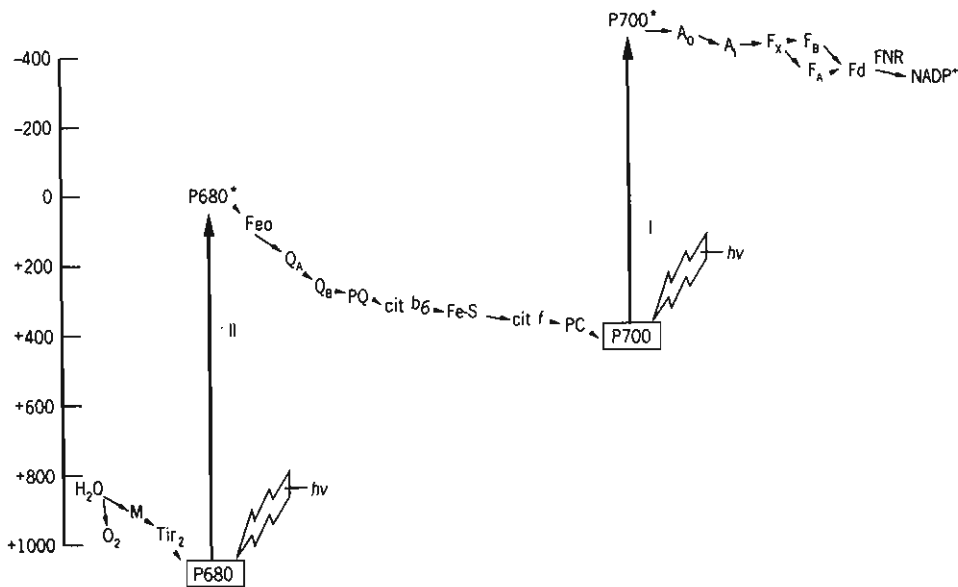
trones viajan del agua al NADP^+ por acción de dos fotosistemas que absorben luz que generan O_2 y NADPH . Además, se establece un gradiente de protones a través de la membrana tilacoide como resultado de la eliminación de H^+ del estroma y liberación de H^+ en la luz tilacoide. La contribución al gradiente de protones (fig. 6-18) tiene su origen en: 1) separación del agua; 2) adición de 2H^+ a Q_B^{2-} para formar $\text{Q}_\text{B}\text{H}_2$ y la liberación subsecuente de los protones por el citocromo b_6f ; y 3) reducción del NADPH . Es necesario absorber cuando menos ocho fotones (cuatro por cada fotosistema) para la formación de una molécula de O_2 y dos moléculas de NADPH .

6-5 Fotofosforilación

La conversión de un mol de CO_2 a un mol de carbohidrato (CH_2O) requiere el ingreso de una cantidad considerable de energía; específicamente, tres moles de ATP y dos de NADPH (fig. 6-22). El mecanismo para la síntesis de ATP en un cloroplasto es prácticamente idéntico al de la mitocondria y la membrana plasmática de las bacterias aerobias. Igual que en otros casos, la ATP sintasa (fig. 6-18) consta de una pieza cabeza (denominada CF_1 en los cloroplastos), que contiene el sitio catalítico de la enzima, y una pieza basal (CF_0) integrada en la membrana, que forma un canal para



(a)



(b)

FIGURA 6-18. Resumen de las reacciones fotodependientes. a) Resumen del flujo de electrones procedentes de H₂O hacia NADPH a través de los tres complejos transmembrana. Se muestra el menor número de protones translocados a través de la membrana como resultado de la oxidación de dos moléculas de agua. Se pueden translocar otros protones como resultado de la reducción de moléculas adicionales de plastoquinona, la acción de una bomba de protones, o ambos. También se muestra la ATP sintasa de la membrana tilacoide que se analiza en la siguiente sección. Los experimentos sugieren que se requieren tres protones para sintetizar cada molécula de ATP. b) Versión detallada del esquema Z que muestra la energética de los dos fotosistemas y los diferentes transportadores de electrones implicados en las reacciones fotodependientes.

protones. Las dos partes están conectadas por un tallo. Las diferentes partes de la ATP-sintasa se construyen a base de polipéptidos homólogos a los encontrados en las enzimas bacterianas y mitocondriales.

Los grandes complejos ATP-sintasa no se distribuyen uniformemente a través de la membrana tilacoide, pero se localizan de manera preferencial en las laminillas del estroma y en las regiones expuestas de las grana (fig. VE 6-4).

Las piezas cabeza, CF_1 , se proyectan por fuera al interior del estroma conservando la orientación del gradiente de protones, cuya concentración más alta está en la luz tilacoide. Por lo tanto, los protones se desplazan desde el sitio de mayor concentración en la luz por medio de la ATP-sintasa al interior del estroma, y por lo tanto opera el proceso de fosforilación.

Cuando la fotosíntesis se lleva a cabo con cloroplastos aislados, el medio en el cual se encuentran inmersos se alcaliniza conforme los protones son translocados a través de las membranas tilacoides al interior de la luz del tilacoide. Las mediciones efectuadas durante periodos de síntesis máxima de ATP sugieren que hay diferencias de concentración de H^+ de 1 000 a 2 000 veces a través de las membranas tilacoides, lo que corresponde a un gradiente de pH (ΔpH) de 3 a 4 unidades. El movimiento de protones dentro de la luz durante el transporte de electrones se compensa por el movimiento de otros iones, de modo que no se establece un potencial de membrana significativo. Por lo tanto, a diferencia de las mitocondrias, la fuerza motriz de protones (Δp) que actúa en los cloroplastos se debe principalmente o exclusivamente a un gradiente de pH. Puesto que la luz de los tilacoides está prácticamente desprovista de enzimas, el pH bajo de este compartimiento (pH 4.5) no tiene efecto nocivo sobre la actividad celular.

Fosforilación no cíclica en comparación con la cíclica

La formación de ATP durante el proceso de fotosíntesis liberadora de oxígeno se denomina **fotofosforilación no cíclica** debido a que los electrones se desplazan en una vía lineal (o sea, no cíclica) desde H_2O a $NADP^+$ (fig. 6-18). Durante el decenio de 1950 se demostró que cloroplastos aislados eran capaces de formar ATP en ausencia de $NADP^+$ o de CO_2 . Todo lo que se necesita es luz, cloroplastos, ADP y P_i . El proceso descubierto posteriormente se llamó **fotofosforilación cíclica** y se ilustra en la figura 6-19. PSI lleva a cabo la fotofosforilación cíclica de manera independiente de PSII. El proceso se inicia con la absorción de un quantum

de luz en PSI y la transferencia de un electrón de alta energía al aceptor primario. A partir de allí, el electrón se transfiere a lo largo de la ferredoxina, como siempre es el caso, pero en vez de transferirse al $NADP^+$ el electrón pasa de nuevo al centro de reacción deficiente en electrones, para completar el ciclo. Durante el flujo de electrones en este trayecto se libera suficiente energía libre para translocar protones a través de la membrana por medio del complejo citocromo b_6f y para establecer un gradiente de protones capaz de efectuar la síntesis de ATP. La preponderancia de fotofosforilación cíclica en comparación con la no cíclica en un cloroplasto particular refleja presumiblemente las necesidades de la célula de ATP, NADPH y carbohidratos en ese momento.

6-6 Fijación de dióxido de carbono y formación de carbohidratos

Después de la segunda guerra mundial, Melvin Calvin y sus colegas, de la Universidad de California, en Berkeley, iniciaron lo que se conoció como el decenio largo del estudio de las reacciones enzimáticas mediante las cuales se asimila dióxido de carbono en las moléculas orgánicas de las células. Armados con el recientemente disponible isótopo radiactivo de carbono (^{14}C) de vida media prolongada, y la nueva técnica de cromatografía bidimensional en papel, emprendieron la tarea de identificar todas las moléculas marcadas formadas donde se permite a las células utilizar $[^{14}C]O_2$. Los estudios comenzaron con hojas de plantas, pero pronto se cambió a un sistema más sencillo, el alga *Clorella*. Las algas cultivadas crecieron en cámaras cerradas en presencia de CO_2 no marcado y luego se introdujo CO_2 radiactivo (en forma de gas disuelto) mediante inyección en el medio de cultivo. Luego de determinado tiempo de incubación con CO_2 marcado, se drenó de líquido la suspensión de algas y se pasó a un contenedor con alcohol caliente para matar las células de inmediato, deteniendo la actividad enzimática, y para extraer moléculas solubles. A continuación se colocaron los extractos de las células como puntos sobre papel cromatográfico y sujetos a cromatografía bidimensional. Para identificar el sitio de los compuestos radiactivos al final del procedimiento, se comprimió un pedazo de película de rayos X contra el cromatógrafo y las placas se mantuvieron en la oscuridad para exponer la película. Después de revelar las fotografías, los compuestos radiomarcados se identificaron comparando los estándares conocidos y también por análisis químicos.

La vía C_3

Se encontró que la conversión de CO_2 marcado a compuestos orgánicos reducidos ocurre de manera muy rápida. Si el periodo de incubación es muy breve (unos pocos segundos), predomina un punto de radiactividad sobre el cromatograma (fig. 6-20). Se determinó que el compuesto es un 3-fosfoglicerato (PGA), uno de los intermediarios de la glucólisis. Puesto que el primer intermediario que se identificó fue la molécula PGA de tres carbonos, estas reacciones se cono-

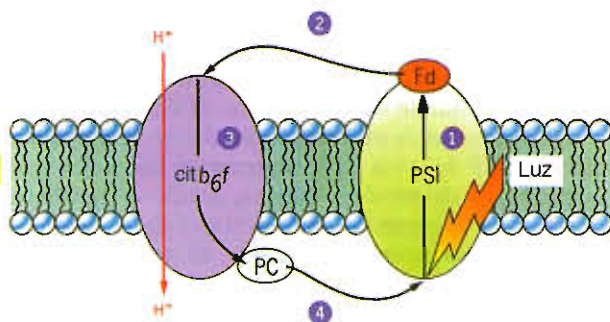


FIGURA 6-19. Esquema simplificado de la fotofosforilación cíclica. La absorción de luz por PSI excita un electrón que se transfiere a la ferredoxina (paso 1) y al citocromo b_6f (2), a plastocianina (3), y regresa a $P700^+$ (4). En el proceso, el complejo citocromo transloca protones.

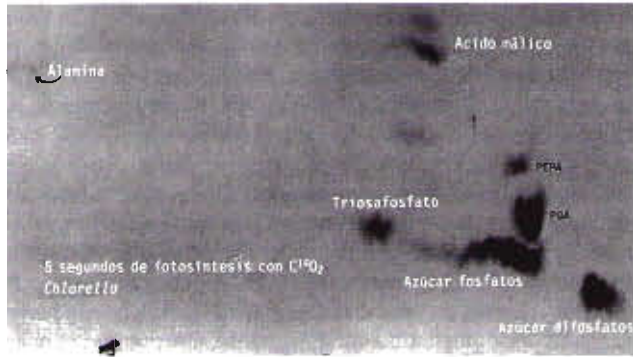


FIGURA 6-20. Cromatograma que muestra los resultados de un experimento en el cual células de algas se incubaron durante cinco segundos con $^{14}\text{CO}_2$ antes de sumergirlas en alcohol. Un punto, que corresponde a 3-fosfoglicerato (PGA marcado) contiene la mayor parte de la radiactividad. (Cortesía de James Bassham y Melvin Calvin.)

cieron como vía C_3 . Inicialmente, Calvin sospechó que el CO_2 se unía por enlaces covalentes (o se fijaba) a un compuesto de dos carbonos. Sin embargo, luego de una investigación considerable se descubrió que el aceptor inicial era un compuesto de cinco carbonos, ribulosa 1,5-difosfato (RuBP), el cual al condensarse con CO_2 forma una molécula de seis carbonos. Este compuesto de seis carbonos se fragmenta de inmediato en dos moléculas de PGA, una de las cuales contiene el átomo de carbono recién añadido.

El papel de la ribulosa 1,5-difosfato como aceptor de CO_2 se demostró en varios experimentos, como el ilustrado en la figura 6-21. Es bien sabido que cuando se administra CO_2 marcado a las células, luego de cierto periodo cada uno de los puntos presenta máxima radiactividad; o sea, se saturan de radiactividad. Se ha observado que las células expuestas durante suficiente tiempo a $^{14}\text{C}\text{O}_2$ en la luz para saturar de radiactividad a los intermediarios presentan ele-

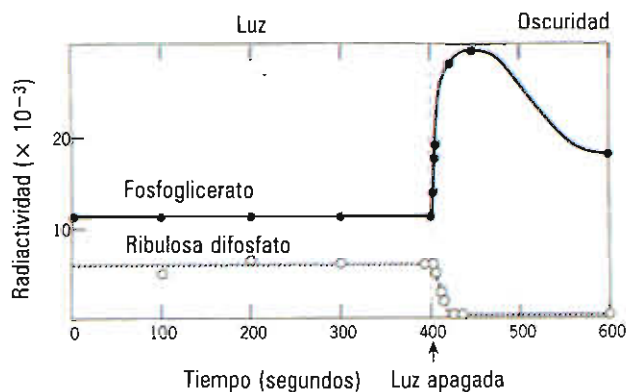


FIGURA 6-21. Datos en apoyo de la hipótesis de que RuBP es el compuesto al cual se fija el CO_2 . Cuando se apagaron las luces que iluminaban un cultivo de algas con una cantidad máxima de isótopos marcados, hubo un descenso casi inmediato de la concentración de RuBP y la correspondiente elevación de la concentración de PGA. Esto sería de esperar si se consumiera RuBP durante la fijación de CO_2 , paso que conduce a la formación de PGA.

vación inmediata de radiactividad en PGA y descenso inmediato de radiactividad en ribulosa 1,5-difosfato (fig. 6-21) cuando se apaga la luz. La razón de este resultado se demuestra al considerar la necesidad de ATP y NADPH sintetizados en las reacciones de luz para la síntesis de RuBP (fig. 6-22, b). En ausencia de ATP y de NADPH, el PGA marcado no puede convertirse a otros intermediarios ni pueden formarse nuevas moléculas de RuBP. En contraste, la condensación de CO_2 con RuBP y la subsecuente conversión a PGA pueden continuar debido a que esta reacción no depende de productos de alta energía formados en las reacciones con luz. Por consiguiente, la radiactividad de PGA se eleva, en tanto que la radiactividad de RuBP desciende.

Tanto la condensación de RuBP con CO_2 como la separación del producto de seis carbonos (fig. 6-22, a) tienen lugar en el estroma por medio de una enzima grande de múltiples subunidades, *ribulosa difosfato carboxilasa*. Esta enzima, conocida comúnmente como "Rubisco", sólo es capaz de fijar tres moléculas de CO_2 por segundo, y por lo tanto debe estar presente en gran cantidad dentro del cloroplasto. En realidad, Rubisco constituye la proteína más abundante sobre la Tierra, y equivale a casi la mitad de la proteína de la mayor parte de las hojas o cerca de 10 kg por cada ser humano del planeta.

Conforme se determinó la estructura de varios intermediarios, junto con la posición de los átomos de carbono marcados, cada vez fue más aparente que la vía para convertir CO_2 en carbohidratos es básicamente circular. En la figura 6-22, b, se muestra una versión "abreviada" de la vía. El círculo comprende tres partes principales: 1) carboxilación para formar PGA; 2) reducción de PGA a gliceraldehído 3-fosfato (GAP) utilizando el NADPH y el ATP formados por transporte de electrones en las reacciones dependientes de luz, y 3) la regeneración de RuBP, que requiere ATP adicional. En la figura 6-22, b, se puede observar que por cada seis moléculas fijadas de CO_2 se producen 12 moléculas de GAP (GAP es el punto marcado como triosa fosfato sobre el cromatograma de la figura 6-20). Los átomos en 10 de estas moléculas GAP de tres carbonos se redistribuyen para regenerar seis moléculas del aceptor de cinco carbonos de CO_2 , RuBP (fig. 6-22, b). Las otras dos moléculas GAP se pueden considerar como productos. Estas moléculas GAP pueden exportarse al citoplasma, donde se convierten en el disacárido sacarosa o se oxidan por medio de glucólisis y el ciclo del ácido tricarbónico para suministrar ATP en el citoplasma. Alternativamente, GAP puede permanecer en el cloroplasto, donde se convierte en almidón.

Las moléculas de sacarosa formadas en el citoplasma a partir del GAP de la vía C_3 se transportan fuera de las células de la hoja y dentro de la corteza, donde se transfieren a los diferentes órganos no fotosintéticos de la planta. Así como la glucosa sirve como fuente de energía y unidad orgánica de construcción en la mayor parte de los animales, la sacarosa tiene un papel análogo en casi todas las plantas. Por otra parte, el almidón se almacena dentro de las células vegetales en forma de gránulos (fig. 2-16, b). De la misma manera que el glucógeno almacenado suministra a los animales una glucosa rápidamente disponible en tiempos de necesidad, el almidón almacenado en las hojas proporciona

azúcares a la planta durante la noche cuando cesa la fotosíntesis.

De las reacciones de la figura 6-22, *b*, es evidente que la formación de carbohidratos es una actividad costosa. La conversión de seis moléculas de CO_2 a una molécula de azúcar de seis carbonos y la regeneración de RuBP requiere 12

moléculas de NADPH y 18 moléculas de ATP. Este gran consumo de energía refleja el hecho de que CO_2 es la forma más altamente oxidada de la cual se puede obtener carbono. Las reacciones que constituyen la vía C_3 (también denominada ciclo Calvin o ciclo de reducción de la pentosa fosfato) ocurren en cianobacterias y en todas las células fo-

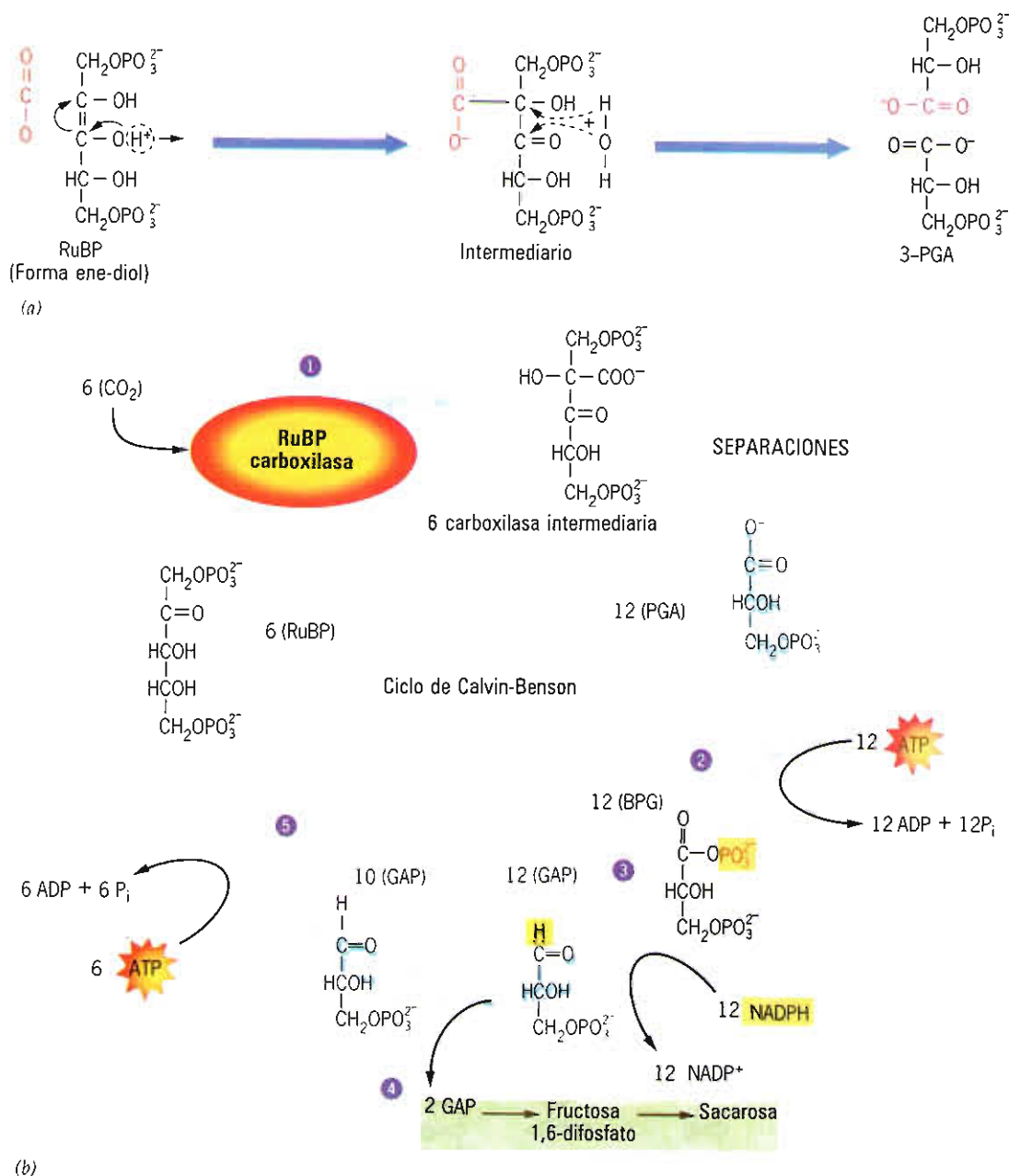


FIGURA 6-22. Conversión de CO_2 en carbohidrato. *a)* Reacción catalizada por ribulosa difosfato carboxilasa para fijar CO_2 por unión a RuBP. El producto se desdobra rápidamente en dos moléculas de 3-fosfoglicerato. *b)* Una versión abreviada del ciclo de Calvin que muestra el destino de seis moléculas de CO_2 fijadas por combinación con seis moléculas de RuBP. (Se han borrado numerosas reacciones.) La fijación de CO_2 se indica en el paso 1. En el paso 2 se fosforilan las 12 moléculas PGA para formar 12 moléculas de 1,3-difosfoglicerato, que en el paso 3 sufren reducción por electrones suministrados por NADPH para formar 12 moléculas de gliceraldehído 3-fosfato (GAP). En el caso que aquí se muestra, se eliminan dos moléculas GAP (paso 4) para emplear en la síntesis de sacarosa en el citosol, que se puede considerar el producto de las reacciones independientes de luz. Las otras 10 moléculas se convierten en seis moléculas de RuBP (paso 5), que pueden actuar como aceptores de seis moléculas más de CO_2 . La regeneración de 6 RuBP requiere la hidrólisis de seis moléculas de ATP. NADPH y ATP empleados en la formación de carbohidratos en el ciclo de Calvin son los dos productos de alta energía de las reacciones foto-dependientes.

tosintéticas eucariotas; forman la única vía significativa para que el carbono inorgánico presente en la atmósfera se convierta en las complejas moléculas biológicas necesarias para la vida. La mayor parte de las enzimas del ciclo Calvin también se encuentran en otras vías, incluyendo la glucólisis. Una vez más, es evidente la importancia de las membranas en la compartimentalización celular. Aunque muchos de los intermediarios formados en el ciclo Calvin también son sustratos en otras vías, su formación dentro del estroma del cloroplasto los aísla de las enzimas del citoplasma.

Fotorrespiración

Un punto de los que aparecieron en los primeros cromatogramas de los trabajos de Calvin con células de algas se identificó como el compuesto glucolato, el cual fue ignorado (correctamente) al formular la vía C_3 de la figura 6-22. Aunque el glucolato no forma parte de la vía C_3 , es producto de una reacción catalizada por Rubisco. Casi 20 años después de observar que Rubisco cataliza la unión de CO_2 a RuBP se descubrió que Rubisco también cataliza una segunda reacción, en la cual se une O_2 a RuBP para formar 2-fosfogluconato (fig. 6-23), el cual subsecuentemente se convierte dentro del estroma a glucolato mediante la acción de una enzima. El glucolato formado en el cloroplasto se transfiere a la mitocondria y finalmente conduce a la liberación de CO_2 , como describiremos posteriormente (fig. 6-25).

Esta serie de reacciones implica captación de O_2 y liberación de CO_2 , por lo que se denomina **fotorrespiración**. La fotorrespiración libera moléculas de CO_2 recién fijadas y por esa razón se considera un desperdicio de la energía de

la planta. En realidad, la fotorrespiración puede explicar la pérdida hasta de 50% del dióxido de carbono recién fijado por plantas cultivadas que crecen en condiciones de iluminación muy intensa. Por lo tanto, como sería de esperar, desde hace varios decenios se desarrolla un esfuerzo concertado para desarrollar plantas con menor probabilidad de efectuar la fotorrespiración. Hasta ahora, estos esfuerzos prácticamente han sido infructuosos, como se analiza en detalle en el ensayo *La perspectiva humana: "Mejores" plantas por medio de ingeniería genética*.

Estudios de la actividad enzimática de Rubisco purificado muestran que la enzima no tiene preferencia por CO_2 como sustrato en comparación con O_2 . La razón de esta falta de especificidad es que al parecer ni el CO_2 ni el O_2 se unen al sitio activo de la enzima. Más bien, la enzima se une a RuBP, que adopta la forma enediol mostrada en la figura 6-23. Esta forma de RuBP puede entonces ser atacada por CO_2 o por O_2 para formar PGA o fosfogluconato, respectivamente. Considerada de esta manera, la fotorrespiración parece ser una consecuencia inevitable de las propiedades químicas de RuBP. Puesto que O_2 y CO_2 compiten entre sí, la dirección predominante de la reacción es determinada por la proporción CO_2/O_2 disponible para la enzima. Si las plantas crecen en ambiente cerrado con concentración elevada de CO_2 , tienen capacidad para crecer con mucha mayor rapidez en virtud de su elevada tasa de fijación de CO_2 . Por lo contrario, cuanto mayor sea la concentración relativa de O_2 en comparación con la de CO_2 , la planta participa más en la fotorrespiración y es menor la fijación de dióxido de carbono. Dos grupos de plantas, denominadas C_4 y MAC,

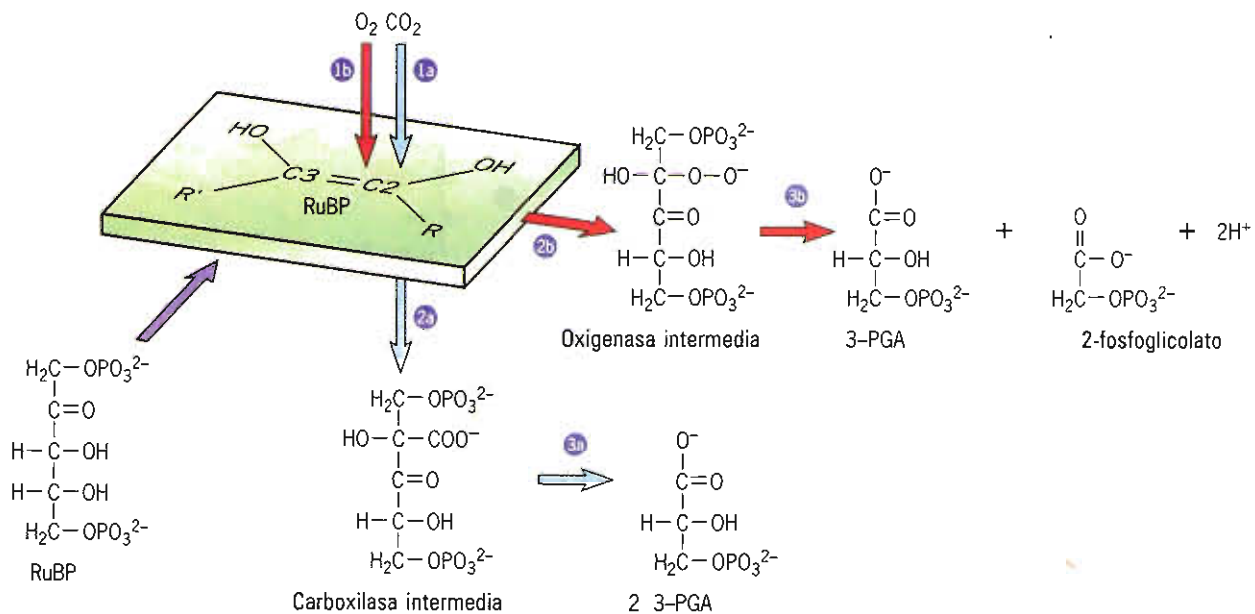


FIGURA 6-23. Reacciones de la fotorrespiración. El Rubisco puede catalizar dos reacciones diferentes con RuBP como sustrato (mostradas en estado enediol dentro del plano). Si RuBP reacciona con O_2 (paso 1b) se produce una oxigenasa intermedia (paso 2b) que se desdobla en 3-PGA y 2-fosfogluconato (paso 3b). Las reacciones subsecuentes de fosfogluconato se muestran en la figura 6-25. El resultado final de estas reacciones es la liberación de CO_2 , una molécula de la que la célula gasta previamente energía para fijarla. En contraste, si la molécula RuBP reacciona con CO_2 (paso 1a), se produce una carboxilasa intermedia (paso 2a) que se rompe en dos moléculas de PGA (paso 3a), la cual continúa a través del ciclo de Calvin.

han superado los efectos negativos de la fotorrespiración desarrollando una innovación evolutiva que incrementa la proporción CO_2/O_2 a la cual se exponen las moléculas de la enzima Rubisco.

Plantas C_4

En 1965, Hugo Kortschak publicó que cuando se suministra $^{14}\text{C}[\text{O}_2]$ a la caña de azúcar, la radiactividad aparece primero en los compuestos orgánicos que contienen un esqueleto de cuatro carbonos y no en la molécula PGA de tres carbonos, como se observa en otros tipos de plantas. Un análisis más detallado reveló que los compuestos de cuatro carbonos (predominantemente malato y oxalacetato) son resultado de la combinación de CO_2 con fosfoenolpiruvato (PEP), y por lo tanto representan un segundo mecanismo de fijación del dióxido de carbono atmosférico (fig. 6-24). La enzima encargada de unir CO_2 a PEP se denominó *fosfoenolpiruvato carboxilasa* y cataliza el primer paso de la *vía C_4* (o *Hatch-Slack*). Las plantas que utilizan esta vía se conocen como **plantas C_4** y están representadas principalmente por las hierbas tropicales. Antes de considerar el destino de estos átomos de carbono recién fijados es útil examinar las razones de la evolución de una vía alternativa para fijar CO_2 .

Cuando se colocan plantas en una cámara cerrada y se vigila su actividad fotosintética, una vez que la concentración de CO_2 en la cámara disminuye a casi 50 partes por millón (ppm), en la mayor parte de los casos se observa que la fotosíntesis prácticamente se detiene. En contraste, una planta que utiliza la vía C_4 continúa la fotosíntesis hasta que la concentración de CO_2 ha descendido a 1 o 2 ppm. La razón de esta diferencia es que la PEP carboxilasa puede seguir operando con concentraciones mucho más bajas de CO_2 en comparación con la enzima Rubisco, pero ¿cuál es el valor de que una planta pueda fijar CO_2 a concentraciones tan bajas cuando la atmósfera invariablemente contiene CO_2 en concentraciones muy superiores a 200 ppm? El problema se complica todavía más cuando se comprueba que: 1) el empleo de PEP requiere un consumo adicional de ATP, y 2) las plantas no tienen una vía biosintética directa que conduzca de malato o de oxalacetato a carbohidrato.

El valor de la vía C_4 es evidente cuando se colocan plantas C_4 en un ambiente seco y caliente, similar al de donde viven muchas de ellas. El problema más grave al que hacen frente las plantas que viven en un clima seco y caliente es la pérdida de agua, llamada **transpiración**, que invariablemente acompaña a la captación de CO_2 . El dióxido de carbono entra a las hojas de las plantas a través de orificios situados en la superficie, denominados **estomas**, y por los cuales el agua también puede escapar. Las plantas C_4 se

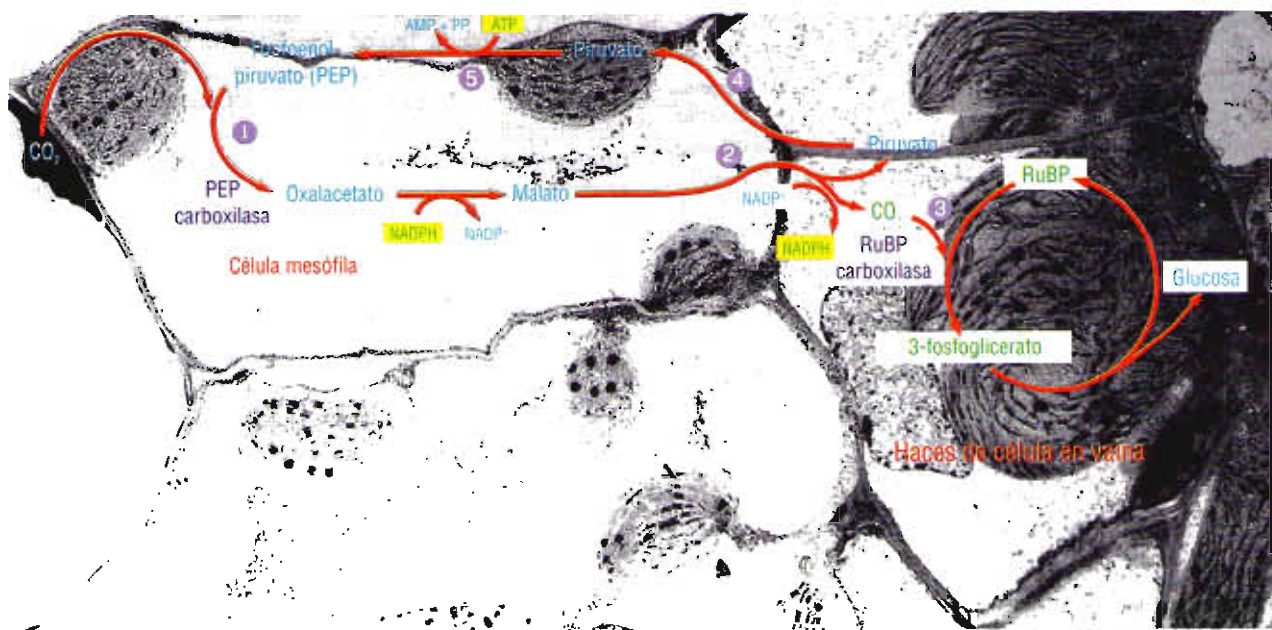


FIGURA 6-24. Estructura y función de las plantas C_4 . Micrografía electrónica de un corte transversal a través de la hoja de una planta C_4 que muestra la relación espacial entre las células mesófilas y los haces de células de las vainas. Superpuestas en la micrografía se encuentran las reacciones de fijación de CO_2 que ocurren en cada tipo de célula. En el paso 1, la enzima carboxilasa PEP une CO_2 a PEP en una célula mesófila localizada cerca del exterior de la hoja. Los compuestos de cuatro carbonos formados se transportan a las células más centrales localizadas en el haz de la vaina (paso 2), donde se libera CO_2 . El CO_2 se concentra mucho en las células de las vainas, lo que favorece la fijación de CO_2 por la enzima carboxilasa RuBP (Rubisco) para formar 3-PGA (paso 3), el cual puede circular a través del ciclo de Calvin. El piruvato formado cuando se libera CO_2 se envía de regreso a la célula mesófila (paso 4), donde se convierte en PEP. Aunque el proceso requiere la hidrólisis de ATP (paso 5), la elevada proporción de CO_2/O_2 en las células de las vainas reduce al mínimo el efecto de la fotorrespiración. (Micrografía electrónica cortesía de S. Craig.)

adaptan a los ambientes calientes y áridos debido a que tienen la capacidad de cerrar sus estomas para prevenir la pérdida de agua e incluso también pueden mantener una captación suficiente de CO_2 para suministrar combustible a su actividad fotosintética a tasa máxima. Se dice que son fotosintetizadores de “elevada eficiencia” debido al alto grado de fotosíntesis por unidad de agua perdida. Por esta razón, las hierbas silvestres, plantas C_4 , tienden a invadir los terrenos, desplazando a las hierbas domésticas C_3 originalmente plantadas. La caña de azúcar, el maíz y el sorgo son las plantas cultivadas más importantes que utilizan la vía C_4 . Puesto que las plantas C_4 se desarrollan escasamente en temperaturas frías, su distribución está muy limitada a latitudes al sur y al norte.

Como se mencionó anteriormente, no hay vía directa de malato o de oxalacetato a carbohidrato. Cuando se sigue el destino del CO_2 fijado por medio de la vía C_4 , se observa que el grupo CO_2 pronto se libera sólo para ser capturado por Rubisco y convertido en un intermediario metabólico de la vía C_3 (fig. 6-24). La razón para que las plantas C_4 participen en este metabolismo aparentemente paradójico es evidente cuando se examina la anatomía de sus hojas. A diferencia de las plantas C_3 , las hojas de las plantas C_4 contienen dos cilindros concéntricos de células. El cilindro exterior está formado por células mesófilas y el cilindro interno por haces de células envainadas (fig. 6-24). La fijación de CO_2 a PEP ocurre en las células mesófilas externas. La actividad de la PEP carboxilasa puede continuar, incluso cuando los estomas de las hojas están casi enteramente cerrados y la concentración de CO_2 en las células es muy baja. Una vez formados, los productos C_4 se transportan a los haces de células envainadas, sellados a gases atmosféricos. Una vez dentro de las células envainadas, el CO_2 puede separarse del C_4 transportador, de manera que se produce una concentración elevada de CO_2 en estas células interiores, concentración adecuada para la fijación efectuada por Rubisco. La concentración del dióxido de carbono en las células envainadas puede ser 100 veces mayor en comparación con la mesófila. Por lo tanto, la vía C_4 suministra un mecanismo para controlar la fijación de CO_2 efectuada por la vía menos eficiente C_3 bombeando CO_2 en el haz envainado. Una vez separado el CO_2 del compuesto de cuatro carbonos, el piruvato formado retorna a las células mesófilas para volver a cargar como PEP (fig. 6-24). Además de ahorrar agua, las plantas que utilizan la vía C_4 tienen capacidad para generar una proporción de CO_2/O_2 elevada en el ambiente local de Rubisco, y por lo tanto favorecen el proceso de formación de CO_2 de preferencia al de fotorrespiración. En realidad, de ordinario fracasan todos los intentos para demostrar fotorrespiración en las hojas intactas de C_4 .

Plantas MAC

Menos de 5% de las plantas poseen otra adaptación bioquímica que les permite sobrevivir en hábitat muy calientes y secos, como los desérticos. Estas plantas, denominadas **plantas MAC**, incluyen las suculentas (cactus), utilizan PEP carboxilasa para fijar el CO_2 atmosférico igual que las plantas C_4 , pero efectúan las reacciones que dependen de luz y la

fijación de CO_2 en momentos diferentes del día, en vez de hacerlo en diferentes células de la hoja. (MAC significa *metabolismo ácido de las crasuláceas*, por las plantas de la familia *Crassulaceae*, en las cuales se descubrió por primera vez.) Las plantas C_3 y C_4 abren sus estomas y fijan CO_2 durante el día, pero las plantas MAC mantienen sus estomas fuertemente cerrados durante las horas diurnas de mayor calor y sequedad. Luego, durante la noche, cuando la tasa de pérdida de vapor de agua se ha reducido mucho, abren sus estomas y fijan CO_2 por medio de la PEP carboxilasa. Conforme se fija más y más dióxido de carbono durante la noche, el ácido málico generado se transporta a través de la membrana del tonoplasto al interior de las vacuolas de la célula. La presencia de este ácido C_4 se manifiesta por el “sabor matinal” agrio de la planta. Durante las horas del día, los estomas se cierran y el ácido málico se desplaza al interior del cloroplasto. En ese sitio cede su CO_2 , el cual puede ser fijado a RuBP por el Rubisco en las condiciones de baja concentración de O_2 que existen cuando los estomas están cerrados. Los carbohidratos se forman utilizando ATP y NADPH generados por las reacciones dependientes de luz.

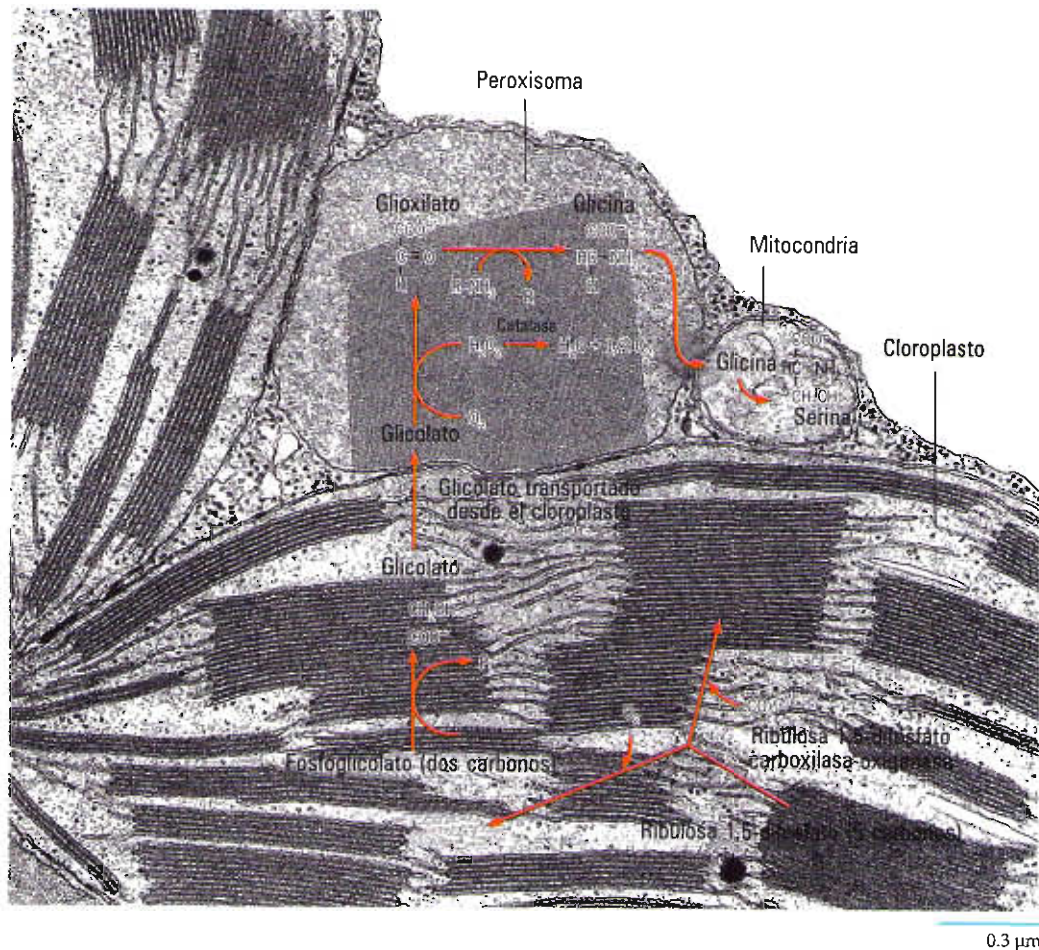
Peroxisomas y fotorrespiración

Los peroxisomas son organelos citoplásmicos cuyo papel en el mecanismo oxidativo de las células animales se analizó en la sección 5-7 del capítulo anterior. Los peroxisomas también están presentes en ciertas células vegetales. Estudios acerca de peroxisomas de células de hojas muestran un notable ejemplo de interdependencia entre diferentes organelos. La micrografía electrónica de la figura 6-25 muestra un peroxisoma de la célula de una hoja en estrecha aposición a las superficies de dos cloroplastos adyacentes y en íntima proximidad a una mitocondria cercana. Esta disposición no es fortuita, sino que refleja una relación bioquímica subyacente en donde los productos de un organelo sirven como sustratos en otro organelo. Las reacciones que tienen lugar en los diferentes organelos se superponen en la micrografía de la figura 6-25, y más adelante se presenta un resumen.

Anteriormente se hizo notar que los cloroplastos participan en un proceso denominado fotorrespiración, que se inicia cuando RuBP reacciona con O_2 en vez de CO_2 para formar un compuesto de dos carbonos, el fosfoglicolato. Una vez formado, el fosfoglicolato se convierte a glicolato, el cual se transfiere fuera del cloroplasto en el interior de un peroxisoma donde la enzima glicolato oxidasa lo convierte en glioxilato, el cual puede convertirse entonces a glicina por transaminación. La glicina formada en el peroxisoma puede transferirse a una mitocondria, donde se convierte en serina. La serina producida en la mitocondria se transfiere de regreso al peroxisoma, donde se convierte en glicerato, el cual puede transportarse al cloroplasto y utilizarse en la síntesis de carbohidratos a través de la formación de ácido 3-fosfoglicérico.

Fotoinhibición

La fotosíntesis es un proceso complejo y finamente controlado. Así como demasiado oxígeno puede disminuir el ren-



LA PERSPECTIVA HUMANA

“Mejores” plantas por medio de ingeniería genética

El ser humano ha tratado de modificar el material genético de las plantas durante miles de años mediante selección de cultivos e hibridación. Con el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante, los genetistas de plantas lograron modificar selectivamente genes específicos que codifican características de interés para la agricultura, de modo que se desarrollaron nuevas especies con mejores características. Entre los rasgos que los genetistas de plantas les gustaría modificar está el grado de resistencia a sustancias químicas que matan plantas (herbicidas) y el nivel de resistencia a la fotorrespiración; ambos incluyen temas que analizaremos en este capítulo.

Algunos de los herbicidas comunes, incluyendo diurón, atrazina y terbutrina, actúan enlazándose a la proteína D1 de PSII. En la página 218 vimos cómo la absorción de la luz por PSII conduce a producir una molécula PQH_2 , que posteriormente se libera de un sitio (el sitio Q_B) de la proteína D1 y es sustituido por una PQ de la reserva. Los herbicidas mencionados antes actúan enlazándose al sitio Q_B abierto luego de liberar PQH_2 , al bloquear el transporte de electrones a través de PSII.

Recordemos que el centro de reacción fotosintético (CRF) de las bacterias púrpura se parece mucho al de PSII, tanto en estructura como en mecanismo de operación. La operación del CRF bacteriano normalmente es inhibida por el herbicida terbutrina, causando la muerte de las células. La difracción por rayos X de estas preparaciones revela una bolsa en la proteína del centro de reacción, a la cual se une la molécula de terbutrina. Se han aislado algunas bacterias mutantes resistentes a terbutrina. Inversamente, una bacteria mutante (el mutante T4)

es sensible a los herbicidas fenólico y de tipo urea, agentes que normalmente actúan sobre las plantas pero que no tienen efectos sobre bacterias púrpura. El mapeo genético de los sitios de estas diferentes mutaciones ha puntualizado las partes de la proteína bacteriana implicadas en el enlace con el herbicida. Puesto que la proteína D1 de los fotosistemas vegetales presenta una homología estrecha con las proteínas bacterianas, estos datos abrieron la puerta a modificaciones selectivas del gen D1 para alterar la resistencia de las plantas a estos herbicidas.

Los agrónomos tienen la esperanza de emplear técnicas de ingeniería genética para incrementar la sensibilidad de las plantas no deseadas (p. ej., maleza) a los herbicidas, en tanto se aumenta la resistencia a los herbicidas en plantas de valor en horticultura o agricultura. Si se pudiera lograr esto, la utilidad de los herbicidas aumentaría mucho. En años recientes se han aislado de plantas o de microorganismos varios inhibidores PSII, como gramidol, estigmatolina, auracinas y cianobacterinas. Un estudio más detallado de estos “herbicidas” naturales puede llevar a la producción de nuevos exterminadores de maleza menos peligrosos para el ambiente.

Una de las metas más difíciles de lograr para los biólogos moleculares de plantas es diseñar una versión del Rubisco, la enzima fijadora del CO_2 de todas las plantas, que sea menos susceptible a la fotorrespiración (página 226). En el texto se hizo notar que el Rubisco actúa como oxigenasa (enzima fijadora de O_2) y como carboxilasa (enzima fijadora de CO_2). El Rubisco sería menos susceptible a la fotorrespiración si se pudiera alterar su estructura, de modo que su actividad oxigenasa disminuyera en relación con su activi-

dad carboxilasa. Aunque los intentos para modificar la enzima e incrementar su capacidad de fijación de CO_2 a expensas de la fotorrespiración no tuvieron éxito en el pasado, estudios recientes acerca de microorganismos han aumentado el optimismo de que puede lograrse este objetivo.

Los organismos más útiles en esta tarea han sido: 1) la bacteria no sulfurosa púrpura *R. rubrum*, cuyo Rubisco funcional requiere la expresión de un solo gen sencillo en vez de dos, como en las plantas, y 2) el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, que tiene capacidad de fotosíntesis pero puede crecer en ausencia de fotosíntesis tanto como su entorno contenga nutrientes orgánicos.

Se han aislado cepas mutantes de estos microorganismos que expresan mayor actividad carboxilasa y menor actividad oxigenasa en comparación con el tipo nativo. Por consiguiente, el crecimiento de estas cepas en presencia de concentraciones elevadas de O_2 no inhibe la fotosíntesis hasta un grado cercano a lo que normalmente ocurriría. En la actualidad se están efectuando estudios para determinar la razón de que estos mutantes muestren menor actividad oxigenasa. Una hipótesis es que la sustitución de aminoácidos altera el canal por el cual los gases atmosféricos llegan al sitio activo de la enzima, y por lo tanto el canal es menos accesible a O_2 . Puesto que la fotorrespiración desempeña un papel importante en la reducción de la productividad de la mayor parte de las cosechas de vegetales, cualquier éxito para desarrollar cepas de plantas menos susceptibles a O_2 tendría mayor impacto en la producción de alimentos.

LA VIA EXPERIMENTAL

Organización de la membrana tilacoide

Con el descubrimiento de que la fotosíntesis requiere la cooperación de dos fotosistemas distintos conectados por una cadena transportadora de electrones, se asumió que todos los componentes que participan en el transporte de electrones residen en muy estrecha proximidad en la membrana tilacoide. Como se indica en la figura 6-4 y se analiza en el texto acompañante, los tilacoides normalmente ocurren como parte de pilas interconectadas (o grana). La membrana del estroma tilacoide (laminitas que interconectan las grana) se conoce como *membrana no comprimida* debido a que reside en contacto con el estroma, más bien que comprimida contra otra membrana. En contraste, la mayor parte de las grana de la membrana tilacoide se conocen como *membrana comprimida* debido a que su superficie externa está comprimida contra la superficie externa de un tilacoide adyacente. Las excepciones son los bordes laterales y las superficies superior e inferior de las grana tilacoides, que también están en contacto con el estroma (fig. VE 6-1).

En los años de 1960 y 1970, varios laboratorios intentaron determinar la distribución en las membranas tilacoides de diferentes componentes implicados en la fotosíntesis. En los primeros estudios se trató de fraccionar la membrana tilacoide en regiones de grana y estromatosas mediante centrifugación diferencial de las vesículas de la membrana formadas luego de romper los cloroplastos por fuerzas mecánicas de corte, vibraciones de ultrasonido de alta frecuencia o tratamiento con detergentes.¹⁻³ Los estudios se complementaron con el examen microscópico de las partículas visibles en la membrana tilacoide mediante fracturas por congelación (fig. 4-18).⁴ Los resultados de estos primeros estudios condujeron a formular el modelo de la membrana tilacoide mostrado en la figura VE 6-2, en el cual los complejos PSII se restringen a las membranas

comprimadas de las grana, los complejos PSI están presentes en las regiones comprimidas y no comprimidas de las grana, las moléculas de ATP-sintasa se proyectan hacia afuera de las regiones no comprimidas, y las moléculas Rubisco se encuentran laxamente enlazadas a la superficie externa de la membrana no comprimida.

Estos datos establecieron el concepto de que la membrana comprimida de las grana contiene ambos fotosistemas y representa el sitio de transporte de electrones para la fotosíntesis no cíclica. Se pensó que la membrana no comprimida era el sitio de fosforilación cíclica (la cual sólo requiere la participación de PSI) y de la síntesis de ATP (gobernada por el gradiente de protones y que por lo tanto no tiene que estar físicamente relacionada con otra parte del mecanismo de fotosíntesis).

En 1980, el concepto de una íntima relación entre los dos fotosistemas de la membrana tilacoide de las grana fue motivo de controversia. Se desarrollaron mejores técnicas para distinguir entre membranas comprimadas y no comprimidas. Por ejemplo, se descubrió que cuando los cloroplastos se rompen mecánicamente utilizando presión o fuerza a través de un pequeño orificio, los segmentos de membrana tilacoide adyacentes a las regiones comprimidas de las grana se funden entre sí para formar vesículas cuya superficie externa corresponde a la superficie interna de la membrana tilacoide (fig. VE 6-3). Las vesículas de este tipo se describen como "vesículas con lo de adentro por afuera".⁵ El resto de la membrana (estroma tilacoide, membranas de granos terminales, y bordes de los granos) forma vesículas, en las cuales la superficie externa de los tilacoides se convierte en la superficie externa de la vesícula (denominadas "vesículas con el lado correcto hacia afuera").

Los dos tipos de vesículas se pueden separar, dependiendo de la diferencia de las propiedades de superficie, como carga e hidrofobicidad. Las vesículas con lo de adentro hacia afuera ejecutan las actividades características de PSII con poca contribución de PSI. Si los tilacoides del cloroplasto fueran tratados en un medio escaso en sal antes de romperlos, tratamiento que desapila los tilacoides de los granos y por lo tanto elimina las membranas comprimadas, no se formarían las vesículas con el lado interno hacia afuera. Estos datos condujeron al modelo propuesto por Bertil Andersson y Jan Anderson, de la Universidad de Lund, en Suecia,⁶ en el cual PSI y ATP sintasa se localizan casi exclusivamente en la membrana no comprimida, en tanto que PSII se segrega en las regiones comprimidas (fig. VE 6-4). El único complejo mayor de proteínas distribuido regularmente entre los dos tipos de regiones de la membrana es el complejo citocromo *b₆f*, que se sitúa en la cadena transportadora de electrones que conecta PSII con PSI (fig. 6-16).⁷

Las proteínas no son los únicos elementos de las membranas tilacoides que muestran heterogeneidad lateral; también los lípidos. En el texto se hizo notar que las membranas

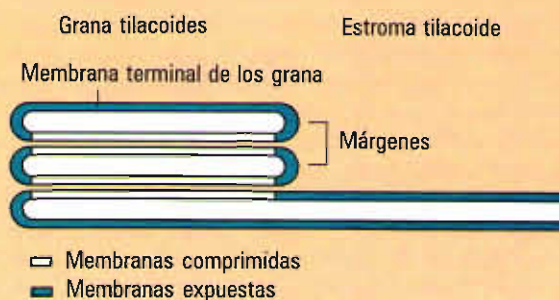


FIGURA VE 6-1. La superficie externa de la membrana tilacoide se puede dividir en dos regiones estructuralmente diferentes: membranas comprimadas de los grana tilacoides cuya superficie está en contacto con otras membranas, y membranas no comprimidas del estroma tilacoide (o estroma laminar), y los extremos y bordes de los grana tilacoides que también están expuestos al estroma. (Según J.M. Anderson, FEBS Lett. 124:1, 1981.)

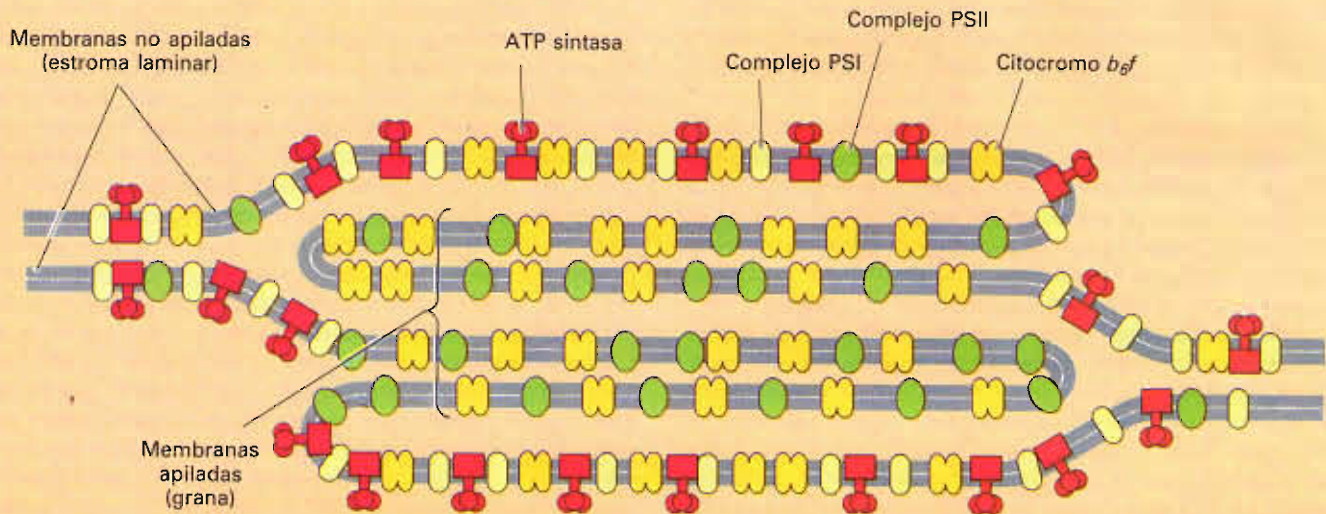
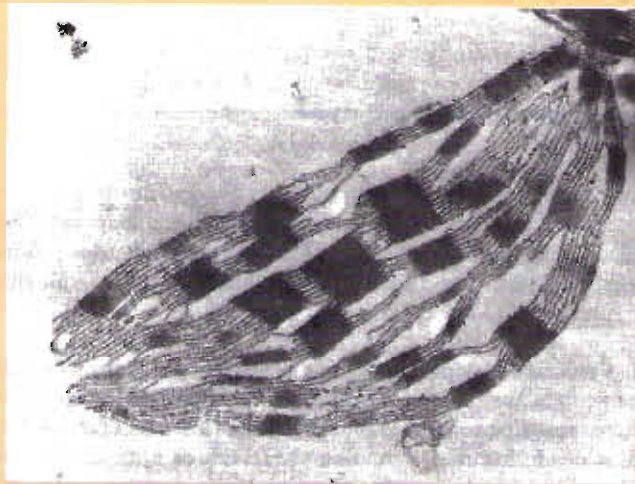


FIGURA VE 6-4. Modelo revisado de la organización de la membrana tilacoide propuesto en 1981; los dos fotosistemas están espacialmente separados: PSII se localiza en la región de las membranas comprimidas y PSI en la región de las membranas no comprimidas. (Según J.M Anderson y B. Andersson, *Trends Biochem. Sci.* 7:291, 1982.)

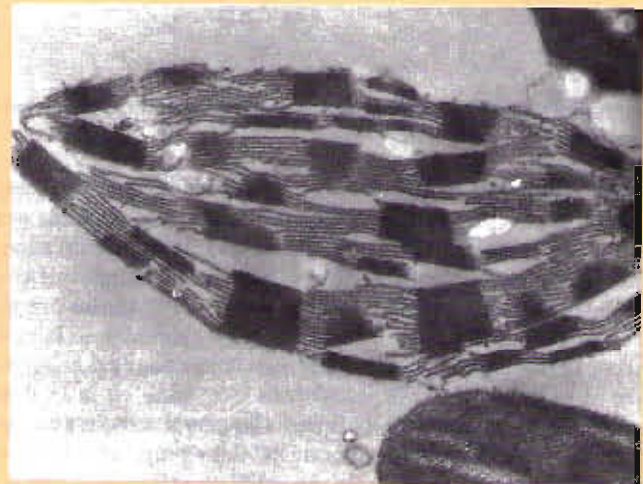
mseg, lo que corresponde a la vida media calculada para la reducción del citocromo *b₆f* luego de una serie de destellos luminosos saturantes. Por lo tanto, incluso si una molécula PQ sigue un camino muy desviado para la difusión entre los dos complejos de proteínas, éste debe ser capaz de hacer la conexión en el tiempo permitido.

En 1977, John Bennett, de la Universidad de Warwick, en Inglaterra, hizo un descubrimiento que posteriormente demostró tener importantes implicaciones en el estudio de la mem-

brana tilacoides. Bennett incubó cloroplastos iluminados en un medio que contenía fosfato marcado con isótopo radiactivo ($^{32}\text{P}_i$), a continuación extrajo las proteínas de los cloroplastos y fraccionó la mezcla de proteínas utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio.¹² Durante la incubación varias proteínas resultaron marcadas con rapidez, una de las cuales se identificó como la principal proteína que enlaza la clorofila *a/b* captadora de luz (referida como LHCII en el texto, página 215). Estudios subsecuentes revelaron la



(a)



(b)

FIGURA VE 6-3. Micrografías electrónicas de cortes delgados de las células mesófilas tilacoides del maíz marcadas con anticuerpos para: a) subunidad D del centro de reacción PSI, y b) citocromo *b-559* del centro de reacción PSII. Los centros de reacción PSI se localizan casi exclusivamente en los tilacoides del estroma y en las membranas terminales de los grana tilacoides, en tanto que los centros de reacción PSII se hallan casi por completo en membranas comprimidas de los grana tilacoides. (Cortesía de O. Vallon.)

presencia en la membrana tilacoides de una proteincinasa encargada de la fosforilación de LHCII.¹³ La atención se volvió al mecanismo de regulación de la cinasa y la importancia de la fosforilación de proteínas captadoras de luz.

Normalmente, LHCII no sufre fosforilación cuando los cloroplastos se incuban en la oscuridad. Sin embargo, la actividad de la proteincinasa no es estrictamente dependiente de luz, debido a que se puede activar incubando cloroplastos en la oscuridad en un medio que contenga un agente fuertemente reductor, como la ferredoxina reducida.¹⁴ Estos resultados sugieren que uno de los transportadores de electrones de la cadena de fotosíntesis debe estar reducido antes de que se active la proteincinasa. Varias piezas sugieren que el componente clave es la plastoquinona, revisada en ¹⁵ La plastoquinona es el aceptor terminal de electrones del centro de reacción PSII (fig. 6-13). Sería de esperar que el fondo común de moléculas de plastoquinona de la membrana se acumule en su estado reducido (PQH₂) conforme los electrones se transfieren a PQ, pero que no pasen a los subsecuentes transportadores. Podría esperarse que esta condición ocurriera en los momentos cuando PSII está operando a un nivel más alto que PSI, o sea, cuando la actividad de los dos fotosistemas está fuera de equilibrio.

Según los diferentes datos, se propuso que la fosforilación de LHCII por la proteincinasa activada sirve para corregir el desequilibrio resultante de la superexcitación de PSII en relación con PSI. Por ejemplo, se demostró que la fosforilación de LHCII incrementa la transferencia de energía de excitación a PSI a expensas de PSII.¹⁶ La explicación molecular más simple para estos datos es que la fosforilación disocia LHCII de PSII en los sitios donde normalmente reside de las regiones comprimidas de la membrana tilacoide. El complejo LHCII fosforilado tendría entonces que emigrar a las regiones no comprimidas de la membrana, donde se pone en estrecho contacto con PSI, y por lo tanto permite la transferencia de la energía de excitación al centro de reacción PSI.

Esta conclusión concuerda con los resultados de los análisis de las fracturas por congelación, en las cuales partículas de 8.0 nm pueden representar los complejos captadores de luz que en la membrana tilacoide de los cloroplastos de guisantes se redistribuyen de las regiones comprimidas a las no comprimidas después de la fosforilación.¹⁷ También es consistente con el dato de que las proteínas captadoras de luz en las fracciones de membrana aisladas de las regiones no comprimidas están 10 veces más intensamente fosforiladas que las mismas proteínas en las regiones comprimidas.¹⁸ Las regiones comprimidas de la membrana son sitios donde las proteínas de las membranas adyacentes entran en estrecho contacto entre sí. La fosforilación de las proteínas captadoras de luz añadiría cargas negativas a la superficie de la proteína, lo que puede causar que la proteína experimente repulsión electrostática por parte de las proteínas vecinas. Este tipo de repulsión fue sugerido como la mayor fuerza que aparta el LHCII fosforilado de las porciones comprimidas del tilacoide.^{19,20} Estudios subsecuentes indican que en la mayor parte de las situaciones sólo la reserva exterior de LHCII que contiene los polipéptidos rápidamente fosforilados se desplaza al interior del estroma tilacoide después de la fosforilación, dejando que la reserva interna de proteínas LHCII permanezca con PSII.²¹

El desplazamiento de los complejos LHCII de una parte del tilacoide a la otra puede desempeñar varias funciones en la fotosíntesis, además de corregir el desequilibrio entre los dos fotosistemas. Por ejemplo, casi todo el daño al aparato de fotosíntesis causado por luz de alta intensidad lo experimenta PSII (pág. 228). Puesto que la exposición a luz brillante conduce a la fosforilación de LHCII y a separarlo de PSII, este fenómeno podría limitar el daño a PSII por sobreexcitación. La migración de LHCII también puede servir para regular el equilibrio entre la fosforilación cíclica y la no cíclica. Algunos de los primeros estudios indicaron que la proteincinasa tilacoide también es sensible a la proporción NADP⁺/NADPH del cloroplasto.

SINOPSIS

Se presume que las primeras formas de vida fueron heterótrofos que dependían de moléculas orgánicas formadas por procesos abióticos; con el tiempo, estas formas fueron superadas por autótrofos, organismos capaces de sobrevivir con CO₂ como fuente principal de carbono. Se cree que los primeros autótrofos efectuaban fotosíntesis no oxigénica en la cual compuestos como H₂S eran oxidados como fuente de electrones. La evolución de la fotosíntesis oxigénica, en la cual se oxida agua y se libera O₂, permitió a las cianobacterias aprovechar un número mucho mayor de hábitat y preparar el escenario para la respiración aerobia (p. 207).

Los cloroplastos son organelos grandes enlazados a membrana que tal vez evolucionaron a partir de procariotes fotosintéticos que contenían un sistema interno de membranas tilacoides, el cual aloja al mecanismo fotosintético. Los cloroplastos están enlazados por una doble membrana porosa gra-

cias a la inclusión de porinas en la bicapa de lípidos. Los tilacoides son sacos membranosos aplanados dispuestos en filas ordenadas o grana. Los tilacoides están rodeados por un estroma fluido que contiene DNA, ribosomas y el mecanismo requerido para la expresión del gen (p. 208).

Las reacciones dependientes de luz de la fotosíntesis empiezan con la absorción de fotones por los pigmentos fotosintéticos, suceso que impulsa los electrones a los orbitales externos, desde los cuales pueden ser referidos a un aceptor de electrones. Los principales pigmentos que absorben luz en las plantas son las clorofilas y los carotenoides. Cada molécula de clorofila consta de un anillo de porfirina que contiene Mg²⁺ que actúa en la absorción de la luz, y una cola hidrocarbonada (un fitol) que conserva el pigmento integrado a la bicapa. La clorofila absorbe con mayor intensidad en la región azul y roja del espectro visible y con menor fuerza en la región verde. Las

Conforme esta proporción disminuye y la concentración relativa de NADPH aumenta, se reduce la necesidad de transporte no cíclico de electrones. Sería de esperar que la fosforilación de LHCII concentre más energía de excitación en PSI, la cual podría utilizarse para estimular la fosforilación cíclica, proceso que permite al cloroplasto seguir produciendo ATP sin formación de NADPH adicional.

BIBLIOGRAFIA

1. Jacobi, G. y Lehmann, H. 1969. Photochemical activity of chloroplast fragments, en *Prog. Photosyn. Res.*, vol. 2, H. Metzner, ed., p. 159-173.
2. Goodchild, D.J. y Park, R.B. 1971. Further evidence for stroma lamellae as a source of Photosystem I fractions from spinach chloroplasts. *Bioch. Biop. Acta* 226:393-399.
3. Arntzen, C.J. y cols. 1972. Photochemical activity and structural studies of photoxystems derived from chloroplast grana and stroma lamellae. *Bioch. Biop. Acta* 256:85-107.
4. Staehelin, L.A. 1976. Reversible particle movements associated with unstacking and restacking of chloroplast membranes in vitro. *J. Cell Biol.* 71:136-158.
5. Andersson, B., Sundby, C. y Albertson, P.-A. 1980. A mechanism for the formation of inside-out vesicles. *Bioch. Biop. Acta* 599:391-402.
6. Andersson, B. y Anderson, J.M. 1980. Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Bioch. Biop. Acta* 593:427-440.
7. Cox, R.P. y Andersson B. 1981. Lateral and transverse organization of cytochromes in the chloroplast thylakoid membranes. *Bioch. Biop. Res. Comm.* 103:1336-1342.
8. Gounaris, K. y cols. 1983. Lateral heterogeneity of polar lipids in the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *FEBS Lett.* 156:170-174.
9. Allred, D. y Staehelin, L.A. 1985. Lateral distribution of the cytochrome *b₆f* and coupling factor ATP synthetase complexes of chloroplast thylakoid. *Plant Physiol.* 78:199-202.
10. Vallon, O., Wollman, F.A. y Olive, J. 1986. Lateral distribution of the main protein complexes of the photosynthetic apparatus in *C. reinhardtii* and in spinach. *Photobioch. Photobiop.* 12:203-220.
11. Miller, P.A. y Barber, J. 1984. Plastoquinone as a mobile redox carrier in the photosynthetic membrane. *FEBS Lett.* 169:1-6.
12. Bennett, J. 1977. Phosphorylation of chloroplast membrane polypeptides. *Nature* 269:344-346.
13. Alonzo, R., Nelson, N. y Racker. 1980. A light-dependent protein kinase activity of chloroplasts. *Plant Physiol.* 65:730-734.
14. Bennett, J. 1979. Chloroplast phosphoproteins. The protein kinase of thylakoid membranes in light-dependent. *FEBS Lett.* 103:342-344.
15. Bennett, J. 1983. Regulation of photosynthesis by reversible phosphorylation of the light-harvesting Chl *a/b* protein. *Biochem. J.* 212:1-13.
16. Bennett, J., Steinback, K.E. y Arntzen, C.J. 1980. Chloroplast phosphoproteins: Regulation of excitation energy transfer by phosphorylation of thylakoid membrane polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:5253-5257.
17. Kyle, D.J., Staehelin, L.A. y Arntzen, C.J. 1983. Lateral mobility of the light-harvesting complex in chloroplast membranes controls excitation energy distribution in higher plants. *Arch. Bioch. Biop.* 222:527-541.
18. Andersson, B. y cols. 1982. Differential phosphorylation of the light-harvesting chlorophyll-protein complex in appressed and non appressed regions of the thylakoid membrane. *FEBS Lett.* 149:181-185.
19. Barber, J. 1982. Influence of surface charges on thylakoid structure and function. *Ann Rev. Plant Physiol.* 32:261-295.
20. Staehelin, L.A. y Arntzen, C.J. 1983. Regulation of chloroplast membrane function: Protein phosphorylation changes the spatial organization of membrane components. *J. Cell Biol.* 97:1327-1337.
21. Larsson, U.K., Anderson, J.M. y Andersson, B. 1987. Variations in the relative content of the peripheral and inner light-harvesting chlorophyll *a/b* protein complex (LHCII) subpopulations during thylakoid light adaptation and development. *Bioch. Biop. Acta* 894:69-75.

longitudes de onda específicas que absorbe una molécula dependen de los polipéptidos con los cuales está relacionada y las propiedades físicas de la bicapa. Los carotenoides absorben con mayor intensidad en la región azul y verde y con menor intensidad en la roja y naranja. El espectro de acción de la fotosíntesis, que proporciona una medida de la longitud de onda capaz de estimular la fotosíntesis, sigue muy estrechamente el espectro de absorción de los pigmentos. Los pigmentos fotosintéticos se organizan en unidades funcionales en las cuales sólo una molécula, el centro de reacción de la clorofila, tiene capacidad para transferir electrones a un aceptor de los mismos. La masa de las moléculas de pigmento forma un sistema antena captador de luz que atrapa fotones de diferentes longitudes de onda y transfiere la energía de excitación de la molécula del pigmento al centro de reacción (p. 211).

La transferencia de un par de electrones de H₂O a NADP⁺ en condiciones estándar requiere el ingreso de cuando menos 52.6 kcal por mol, que es más energía de la que un mol de

fotones puede suministrar. El impulso energético necesario se logra mediante dos fotosistemas separados, cada uno de los cuales impulsa la energía de los electrones una parte del camino para rebasar la cuesta energética. El fotosistema II (PSII) impulsa los electrones desde un nivel de energía más bajo que el del agua hasta el punto medio, donde el fotosistema I (PSI) eleva los electrones hasta el tope, por arriba de NADP⁺. Conforme los fotones se absorben en cada fotosistema, la energía pasa a los pigmentos en el centro de reacción respectivo (P680 para PSII y P700 para PSI). La energía absorbida por la clorofila del centro de reacción sirve para impulsar un electrón hacia un orbital externo, donde puede transferirse a un aceptor primario, produciendo un pigmento con carga positiva (P680⁺ y P700⁺) (p. 215).

La vía no cíclica de flujo de electrones del agua a PSII y luego a PSI y NADP⁺ se denota por medio de una Z. La primera rama de la Z va de H₂O a PSII. La mayor parte de los pigmentos antena que recolectan luz para PSII residen dentro

de un complejo separado, denominado LHCII. La energía fluye de LHCII hacia el centro de reacción PSII, donde se transfiere un electrón P680 a un aceptor primario, una molécula de feofitina similar a clorofila. Esta transferencia de electrones genera un agente fuertemente oxidante ($P680^+$) y un agente débilmente reductor (Feo⁻). La separación de cargas en PSII se estabiliza separando moléculas con carga opuesta; esto se logra conforme se transfieren electrones de feofitina a la quinona Q_A y luego a Q_B . La absorción sucesiva de dos fotones por PSII conduce a la transferencia de dos electrones a Q_B para formar Q_B^{2-} , que entonces capta dos protones del estroma formando Q_BH_2 (la cual se reduce verdaderamente a plastoquinona). La plastoquinona reducida abandona el centro de reacción y es sustituida por una plastoquinona oxidada capaz de recibir electrones adicionales. El movimiento de electrones a través del centro de reacción PSII sigue una vía similar a la que se observa en el centro de reacción de las bacterias púrpura no azufradas cuya estructura cristalina ya se ha determinado. Conforme cada electrón se transfiere desde P680 al aceptor primario y de allí a Q_B , el agujero en el pigmento del centro de reacción con carga positiva ($P680^+$) se llena con un electrón procedente de un residuo tirosina específico (Tir_Z). Tir_Z, a su vez, recibe electrones, uno cada vez, de una proteína que contiene cuatro iones manganeso. Conforme cada electrón se transfiere a Tir_Z, la proteína que contiene Mn acumula una carga positiva. Una vez que la proteína acumula cuatro cargas positivas tiene capacidad para eliminar cuatro electrones del agua, una reacción que genera O_2 y suministra cuatro H^+ a la luz tilacoide, que contribuye al gradiente de protones (p. 210).

Los electrones de la plastoquinona reducida se transfieren al complejo citocromo multiproteínico b_6f , en tanto que los protones son liberados a la luz tilacoide y por lo tanto contribuyen al gradiente de protones. Los electrones procedentes de citocromo b_6f pasan a la plastocianina localizada en el lado luminal de la membrana tilacoide y a $P700^+$, el pigmento del centro de reacción PSI que ha perdido un electrón luego de absorber un fotón. Conforme se absorbe cada fotón en $P700$ el electrón se transfiere a un aceptor primario Q_A y luego a través de varios centros de hierro y azufre del centro de reacción PSI a la ferredoxina. Los electrones se transfieren de la ferredoxina a $NADP^+$ formando NADPH, que requiere un protón del estroma, contribuyendo al gradiente de protones. En resumen, el flujo no cíclico de electrones produce la oxidación de H_2O a O_2 con transferencia de electrones a $NADP^+$, formando NADPH y estableciendo un gradiente de H^+ a través de la membrana (p. 220).

El gradiente de protones establecido durante las reacciones dependientes de luz proporciona la energía requerida para formar ATP en el cloroplasto, proceso denominado fotofosforilación. El mecanismo para la síntesis de ATP en el cloroplasto es prácticamente idéntico al de la mitocondria; la ATP sintasa consta de una pieza cabeza CF_1 que se proyecta dentro del estroma y una pieza basal CF_0 integrada a la membrana tilacoide. Los protones efectúan la síntesis de ATP a medida que se desplazan a los sitios de mayor concentración de la luz tilacoide por medio de la ATP sintasa y en el interior del estroma, en donde disipan el gradiente H^+ . La síntesis de ATP puede ocurrir en ausencia de oxidación de H_2O por medio de

un proceso de fosforilación cíclica que no implica PSII. La luz es absorbida por $P700$ de PSI, pasa a la ferredoxina y retorna al centro de reacción PSI deficiente en electrones a través del citocromo b_6f . Conforme los electrones se mueven en la vía cíclica, los protones se translocan a la luz tilacoide y posteriormente sintetizan ATP (p. 221).

Durante las reacciones independientes de luz, la energía química almacenada en NADPH y ATP se emplea para la síntesis de carbohidratos a partir de CO_2 . El CO_2 se convierte en carbohidratos en la vía C_3 (o ciclo de Calvin), en la cual se fija CO_2 por medio de la RuBP carboxilasa (Rubisco) a un compuesto RuBP de cinco carbonos, formando un intermedio inestable de seis carbonos que se separa en dos moléculas de ácido 3-fosfoglicérico. NADPH y ADP se emplean para convertir moléculas PGA a gliceraldehído 3-fosfato (GAP). Por cada seis moléculas de CO_2 fijadas se pueden orientar dos moléculas de GAP a la formación de sacarosa o de almidón, en tanto que las 10 moléculas restantes de GAP pueden utilizarse para generar RuBP para un ciclo adicional de fijación de CO_2 (p. 223).

Rubisco también puede catalizar una reacción en la cual O_2 , en vez de CO_2 , se une a RuBP en forma covalente. Este proceso, que se denomina fotorrespiración, conduce a la formación de compuestos metabolizados en reacciones en las cuales se pierde CO_2 . Puesto que la fotorrespiración implica captación de O_2 y liberación de CO_2 , representa un desperdicio de la energía de la planta. La tasa de fotorrespiración en comparación con la fijación de CO_2 depende de la proporción CO_2/O_2 establecida por Rubisco. Dos grupos de plantas, denominadas plantas C_4 y MAC, poseen mecanismos que aumentan esta proporción (p. 225).

Las plantas C_4 y MAC poseen una enzima adicional fijadora de CO_2 denominada PEP carboxilasa, capaz de operar con concentraciones muy bajas de CO_2 . Las plantas C_4 poseen hojas de estructura única que contienen un cilindro externo de células mesófilas y un cilindro interno de haces de células envainadas selladas a los gases atmosféricos. La PEP carboxilasa opera en las células mesófilas, donde se fija CO_2 al compuesto de tres carbonos fosfoenolpiruvato (PEP) para formar un ácido de cuatro carbonos, el cual se transporta a los haces envainados donde se descarboxila. El CO_2 liberado en el haz envainado se acumula en concentración elevada favoreciendo la fijación de CO_2 a RuBP y la formación de PGA y de GAP por medio del ciclo de Calvin. Las plantas MAC efectúan reacciones dependientes de luz e independientes de la misma en diferentes horas del día. Las plantas mantienen estrechamente cerrados sus estomas durante las horas calientes y secas del día, lo que evita la pérdida de agua. A continuación, durante la noche, abren sus estomas y fijan CO_2 por medio de la PEP carboxilasa. El ácido málico producido en estas reacciones se almacena en la vacuola hasta las horas del día cuando el compuesto se desplaza de nuevo al cloroplasto. Allí cede su CO_2 , que puede entonces fijarse por Rubisco en condiciones de baja concentración de O_2 y convertirse a carbohidrato usando ATP y NADPH generados por las reacciones dependientes de luz (p. 227).

PREGUNTAS DE REPASO

1. Describir el efecto que se cree que tuvo la aparición de cianobacterias en el metabolismo de los organismos.
2. ¿En qué son similares la fotosíntesis no oxigénica que emplea H_2S como fuente de electrones y la fotosíntesis oxigénica que utiliza H_2O como fuente de electrones? ¿En qué son diferentes?
3. Describir la organización de las membranas del cloroplasto, incluyendo la disposición de la ATP sintasa. ¿En qué difiere esta organización de la observada en las mitocondrias?
4. ¿Cómo puede una célula vegetal emplear electrones de baja energía procedentes del agua para reducir NADP^+ ?
5. En términos generales, ¿en qué difieren las reacciones independientes de luz de las reacciones dependientes de luz? ¿Cuáles son los productos primarios de los dos grupos de reacciones?
6. ¿Cómo se compara el centro de reacción de una bacteria púrpura no azufrosa *R. viridis* con el centro de reacción fotosintético del cloroplasto de una planta?
7. ¿Cuál es la relación entre el contenido energético de un fotón y la longitud de onda de la luz? ¿De qué manera determina la longitud de onda de la luz si puede o no estimular la fotosíntesis? ¿Cuáles son algunos de los factores que determinan las propiedades de absorción de la molécula de clorofila? ¿Cómo determinan las propiedades de absorción de los pigmentos fotosintéticos la dirección en la cual se transfiere la energía de excitación dentro de una unidad de fotosíntesis?
8. ¿Cuál es el papel de los pigmentos antena que captan luz en la fotosíntesis?
9. ¿Cuál es la diferencia entre un espectro de absorción y un espectro de acción?
10. Describir la secuencia de acontecimientos que ocurren después de la absorción de un fotón por el pigmento del centro de reacción del fotosistema II. Describir los sucesos comparables en el fotosistema I. ¿Cómo se enlazan los dos fotosistemas entre sí?
11. Describir la diferencia de los potenciales redox de los pigmentos del centro de reacción de los dos fotosistemas.
12. Describir el proceso mediante el cual se separa el agua durante la fotólisis. ¿Cuántos fotones debe absorber PSII para que esto ocurra?
13. ¿Cuáles son los pasos en las reacciones dependientes de luz encargadas de generar un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana tilacoide? ¿En qué grado este gradiente se refleja en el gradiente de pH en comparación con el voltaje? ¿Cómo puede el gradiente de protones conducir a la formación de ATP?
14. Describir el plan básico del ciclo de Calvin, indicando las reacciones que requieren ingreso de energía. ¿Por qué se describe como ciclo? ¿Por qué se tiene que conseguir energía en este tipo de vía? ¿Cuáles son los productos finales de la vía?
15. Describir las principales diferencias estructurales y bioquímicas entre las plantas C_3 y las plantas C_4 . ¿Cómo afectan estas diferencias la capacidad de estos dos tipos de plantas para crecer en climas secos y calientes?

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. ¿Cuál de los dos fotosistemas opera con el potencial redox más negativo? ¿Cuál genera el agente reductor más fuerte? ¿Cuál debe absorber cuatro protones durante cada vuelta de la fosforilación no cíclica?
2. ¿Qué tipo de plantas (C_3 , C_4 o MAC) esperaría usted que funcionen mejor si se exponen a luz diurna continua bajo condiciones de calor y sequedad?
3. De las siguientes sustancias: PQH_2 , citocromo reducido b_6 , ferredoxina reducida, NADP^+ , NADPH , O_2 , H_2O , Tir_2^+ , ¿cuál es el agente reductor más fuerte? ¿cuál es el agente oxidante más fuerte? ¿cuál tiene mayor afinidad por electrones? ¿cuál posee los electrones más energéticos?
4. Supongamos que se desea añadir el desacoplador dinitrofenol (DNF) a una preparación de cloroplastos que efectúan la fotosíntesis. ¿Cuál de las siguientes actividades esperaríamos que fuera afectada? 1) Absorción de luz; 2) fosforilación cíclica; 3) transporte de electrones entre PSII y PSI; 4) fotofosforilación no cíclica; 5) síntesis de PGA; 6) reducción de NADP^+ .
5. Calcular la fuerza motriz de protones que se formaría a través de la membrana tilacoide para mantener una diferencia de 10 000 veces la $[\text{H}^+]$ sin diferencia de potencial eléctrico. (La ecuación para la fuerza motriz de protones se encuentra en la página 191.)
6. ¿En qué condiciones se esperaría que una planta participara más intensamente en la fotofosforilación cíclica?
7. Contrastar el cambio de pH del medio que ocurre cuando cloroplastos aislados efectúan la fotosíntesis en comparación con mitocondrias aisladas que efectúan respiración aerobia.
8. En el capítulo precedente se hizo notar que la mayor parte de la fuerza motriz en las mitocondrias se expresa como voltaje. Por lo contrario, la fuerza motriz de protones generada durante la fotosíntesis se expresa casi exclusivamente como gradiente de pH. ¿Cómo se pueden explicar estas diferencias?
9. ¿Cómo se comparan las propiedades redox de los centros de reacción de una bacteria púrpura no azufrosa con los de una planta PSII?
10. ¿Estaría usted de acuerdo en que una planta C_3 tenga que gastar más energía por CO_2 convertido a carbohidrato en comparación con una planta C_4 ? ¿Por qué sí o por qué no?
11. En la fotosíntesis, la captura de energía luminosa da como resultado liberación y subsecuente transferencia de elec-

trones. ¿De qué molécula se derivan originalmente los electrones? ¿En qué moléculas residen finalmente dichos electrones?

12. ¿Cuántas moléculas de ATP y NADPH se requieren en la vía C_3 para sintetizar un azúcar de seis carbonos? Si la síntesis de una molécula de ATP requiriera tres protones, ¿esperaría usted que este requerimiento relativo para ATP y NADPH pudiera satisfacerse por fotofosforilación no cíclica en ausencia de fotofosforilación cíclica?

13. Si feofitina y A_0 (una molécula de clorofila *a*) son aceptores primarios de electrones en PSII y PSI, respectivamente, ¿cuáles son los donadores primarios de electrones de cada fotosistema?

14. Contrastar el papel de tres diferentes átomos metálicos en las reacciones fotodependientes de la fotosíntesis.

15. ¿Sería de esperar que el efecto invernadero (incremento del contenido de CO_2 de la atmósfera) tuviera mayor efecto en las plantas C_4 o en las plantas C_3 ? ¿Por qué?

BIBLIOGRAFÍA

Fotosíntesis en general

- Allen, J.F. 1992. How does protein phosphorylation regulate photosynthesis? *Trends Biochem. Sci.* 17:12-17.
- Barber, J. 1987. *The Light Reactions: Topics in Photosynthesis*, vol. 8. Elsevier.
- Barber, J. ed. 1992. *The Photosynthesis: Structure, Function, and Molecular Biology: Topics in Photosynthesis*, vol. 11. Elsevier.
- Barber, J. y Andersson, B. 1992. Too much of a good thing: Light can be bad for photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 17:61-66.
- Barber, J. y Andersson, B. 1994. Revealing the blueprint of photosynthesis. *Nature* 370:31-34.
- Bogorad, L. 1981. Chloroplasts. *J. Cell Biol.* 91:256s-270s.
- Craemer, W.A. y cols. 1991. Electron transport between PSII and PSI. *Curr. Top. Bioen.* 16:179-222.
- Deisenhofer, J. y Michel, H. 1989. The photosynthetic reaction center from the purple bacterium, *Rhodospseudomonas viridis*. *Science* 245:1463-1473. (Nobel lecture.)
- Feher, G. y cols. 1989. Structure and function of bacterial photoreaction centers. *Nature* 339:111-116.
- Ghanotakis, D.F. y Yocum, C.F. 1990. Photosystem II and the oxygen-evolving complex. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 41:255-276.
- Gobeck, J.H. y Bryant, D.A. 1991. Photosystem I. *Curr. Top. Bioen.* 16:83-177.
- Gobeck, J.H. 1992. Structure and function of photosystem I. *Ann. Rev. Plant Phys.* 43:293-324.
- Gregory, R.P.F. 1989. *Photosynthesis*, 3a. edición, Wiley.
- Kühlbrandt, W. y Wang, D.N. 1991. Three-dimensional structure of plant light-harvesting complex determined by electron crystallography. *Nature* 350:130-134.
- Kühlbrandt, W. y cols. 1994. Atomic model of plant light harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367:614-621.
- Lavergne, J. y Joliet, P. 1991. Restricted diffusion in photosynthetic membranes. *Trends Biochem. Sci.* 16:129-134.
- Nitschke, W. y Rutherford, A.W. 1991. Photosynthetic reaction centers: Variations on a common structural theme? *Trends Biochem. Sci.* 16:241-245.
- Michel, H. y Deisenhofer, J. 1988. Relevance of the photosynthetic reaction center from purple bacteria to the structure of photosystem II. *Biochem.* 27:1-7.

- Nicholls, D.G. y Ferguson, S.J. 1992. *Bioenergetics* 2. Academic Press.
- Staehelin, L.A. y Arntzen, C.J., eds. 1987. *Photosynthetic Membranes and Light Harvesting Systems: Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. 19. Springer-Verlag.

- Trissl, H.W. y Wilhelm, C. 1993. Why do thylakoid membranes from higher plants form grana stacks? *Trends Biochem. Sci.* 18:415-419.

- Youvan, D.C. y Marrs, B.L. 1987. Mechanisms of photosynthesis. *Sci. Am.* 256:42-49 (junio).

La perspectiva humana

- Culotta, E. y cols. 1995. Emerging plant science: frontiers in biotechnology. *Science* 268:654-691.

- Hardy, R.W.F. y Giaquinta, R.T. 1984. Molecular biology of herbicides. *Bioess.* 1:152-156.

- Sinning, I. 1992. Herbicide binding in the bacterial photosynthesis reaction center. *Trends Biochem. Sci.* 17:150-154.

Importación de proteínas al interior del cloroplasto (no tratado en el texto)

- Gray, J.C. y Row, P.E. 1995. Protein translocation across chloroplast envelope membranes. *Trends Cell Biol.* 5:243-247.
- Schnell, D.J. y cols. 1994. Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science* 266:1007-1012.

Fijación de CO_2 , fotorrespiración y metabolismo de las plantas

- Demmig-Adams, B. 1992. Photoprotection and the other responses of plants to high light stress. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 43:599-626.

- Hartman, F.C. y Harpel, M.R. 1993. Chemical and genetic probes of the active site of Rubisco: a retrospective based on the 3-dimensional structure. *Adv. Enzym.* 67:1-75.

- Kyle, D.J. y cols. 1987. *Photoinhibition: Topics in Photosynthesis*, vol. 9. Elsevier.

- Moore, P.D. 1994. High hopes for C_4 plants. *Nature* 367:322-323.

- Portis, Jr., A.R. 1992. Regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 43:415-437.

- Woodrow, I.E. y Berry, J.A. 1988. Enzymatic regulation of photosynthetic CO_2 fixation in C_3 plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 39:533-594.

Interacciones entre las células y su entorno

7-1 El espacio extracelular

7-2 Adherencia de células a sustratos no celulares

7-3 Adherencia de células a otras células

La perspectiva humana: Papel de la adherencia celular en la inflamación y la metástasis

7-4 Uniones herméticas: sellado del espacio extracelular

7-5 Uniones de abertura y plasmodesmosomas: mediación de la comunicación celular

7-6 Paredes celulares

La vía experimental: Papel de las uniones de abertura en la comunicación intercelular

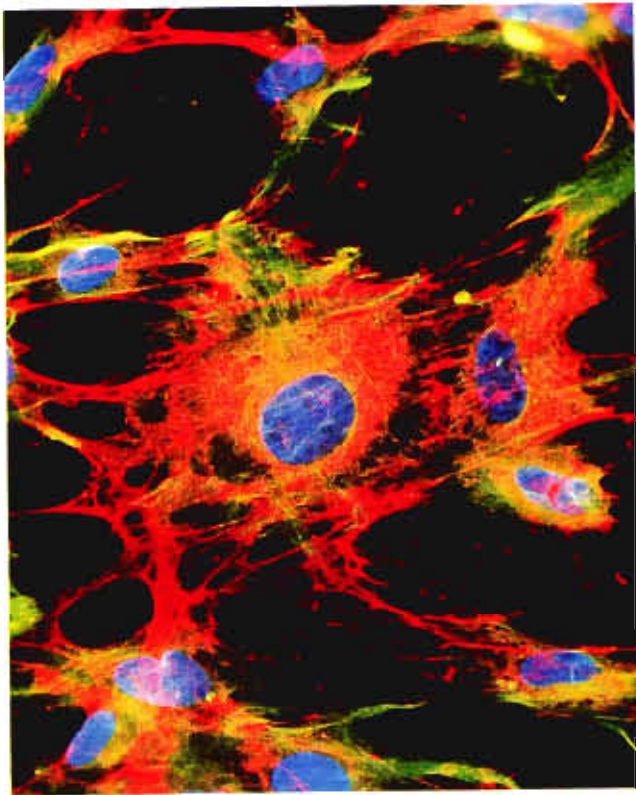


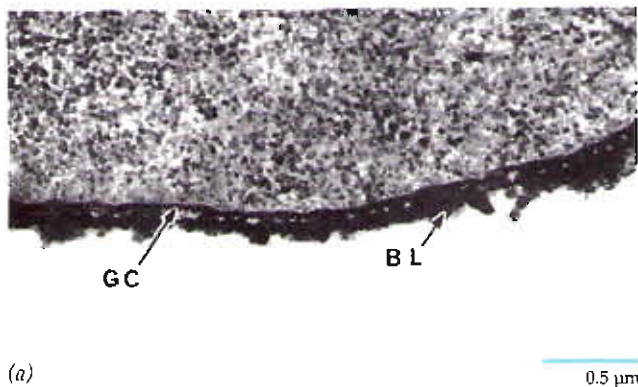
FIGURA 7-A Fibroblasto de piel humana teñido y cultivado con anticuerpos contra fibronectina (mostrados en rojo). El núcleo está teñido con colorante azul que se enlaza a DNA. Se observa la fibronectina localizada en el citoplasma, donde se sintetiza, y en el espacio extracelular, donde aparece más difusa. (Según Nancy Kedersha, Immunogen.)

Aunque la frontera entre una célula viviente y su entorno no viviente es la membrana plasmática, los materiales presentes por fuera de dicha membrana desempeñan un papel muy importante en la vida de la célula. En un animal o planta multicelulares, la mayor parte de las células se organizan en tejidos claramente definidos cuyas células componentes mantienen una relación predecible entre sí y con los materiales extracelulares situados entre las células. Aun células sin relación fija dentro de un tejido sólido, como los leucocitos de la sangre que viajan por todo el cuerpo, deben interactuar de manera muy específica con otras células y los materiales extracelulares con los cuales se ponen en contacto. Estas interacciones regulan actividades tan diversas como migración celular, crecimiento y diferenciación de la célula, y organización tridimensional de los tejidos y órganos que aparecen durante el desarrollo embrionario. Este capítulo se refiere principalmente al entorno extracelular y las diferentes interacciones en las que participan las células.

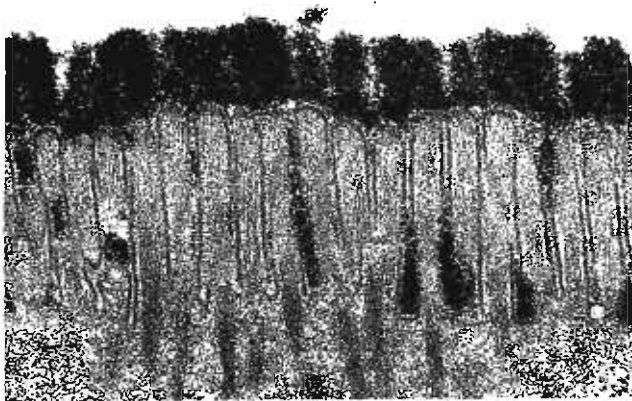
7-1 El espacio extracelular

Desplazándose hacia afuera de la membrana plasmática se pueden examinar los elementos extracelulares que rodean los diferentes tipos de células. En capítulos previos se hizo notar que casi todas las proteínas integrales de membrana, y también los lípidos, poseen cadenas cortas de azúcares

proyectadas hacia afuera de la membrana plasmática (fig. 4-4). Estos carbohidratados forman parte de una capa íntimamente aplicada sobre la superficie exterior de la membrana plasmática denominada **glucocáliz** (o *cubierta celular*) (fig. 7-1, *a*). Además de los carbohidratos de la membrana, el glucocáliz por lo general contiene otros materiales extracelulares secretados por la célula hacia el espacio externo, donde permanecen íntimamente relacionados con la superficie celular. Este material extracelular es muy prominente en algunos tipos de células, como las epiteliales que revisten el conducto digestivo de los mamíferos (fig. 7-1, *b*). Además de desempeñar un papel clave en las interacciones célula-célula y célula-sustrato, el glucocáliz puede suministrar protección mecánica a la célula y servir como barrera contra las partículas que llegan hasta la membrana plasmática.



(a)



(b)

FIGURA 7-1. El glucocáliz. *a*) Superficie basal de una célula ectodérmica de un embrión de pollo en sus primeras etapas. Se pueden distinguir dos estructuras distintas íntimamente aplicadas a la superficie externa de la célula; un glucocáliz interno (GC) y una lámina basal (LB) externa (o membrana basal). El glucocáliz incluye las porciones carbohidrato de las proteínas y lípidos de la membrana, en tanto que la membrana basal es una estructura extracelular organizada distinta de la membrana celular. *b*) Micrografía electrónica de la superficie apical de una célula epitelial del revestimiento del intestino que muestra el glucocáliz, que se ha teñido con la proteína ferritina que contiene hierro. (*a*: Según A. Martínez-Palomo, *Int. Rev. Cytol.* 29:64, 1970; *b*: según S. Ito y D.W. Fawcett/Photo Researchers.)

Muchos tipos de células contienen una **matriz extracelular (MEC)**, red organizada de materiales extracelulares que se halla más lejos de la vecindad inmediata de la membrana plasmática. A veces, la matriz extracelular consta de una mezcla amorfa mal definida de proteínas y polisacáridos, como se puede observar en el espacio extracelular del tejido conectivo laxo, o puede tomar la forma de una estructura distinta cuyo contorno puede observarse con el microscopio de luz (fig. 7-2). La MEC es algo más que un material pasivo protector inerte; puede desempeñar un papel clave en la morfología y actividades de la célula. Por ejemplo, la digestión enzimática de la MEC que rodea células cultivadas de cartílago o células epiteliales de la glándula mamaria provoca notable disminución de la actividad secretoria y de síntesis de las células. Si se añade otra vez al cultivo el material de la matriz extracelular se restablece el estado de diferenciación celular y la capacidad para producir los productos habituales.

Una de las matrices extracelulares mejor definida es la **membrana basal** (o **lámina basal**), capa engrosada de unos 50 a 200 nm que rodea a las células musculares y adiposas y que cubre la superficie basal de tejidos epiteliales, como la piel (fig. 7-3, *a*), el revestimiento interno de los conductos digestivo y respiratorio, y de los vasos sanguíneos. Se piensa que la membrana basal puede participar en el mantenimiento de la polaridad de las células epiteliales; en definir la vía de migración celular; en separar tejidos adyacentes, ayudando así a compartimentalizar un órgano en desarrollo, y en actuar como barrera al paso de las macromoléculas. En esta última función, la membrana basal desempeña un papel importante al evitar que las proteínas salgan de la sangre cuando fluyen a través de los poros de las paredes



FIGURA 7-2. Determinación experimental del espesor de la matriz extracelular. Cuando se desarrollan en cultivo células cartilaginosas (condrocitos), producen una matriz extracelular cuyo contorno se puede observar añadiendo una suspensión de pequeñas partículas, como eritrocitos fijados, como aquí se muestra. Lo extenso de la matriz extracelular que rodea a cada célula se puede medir por el espesor del espacio que queda sin penetrar por la partícula (cabeza de la flecha). La barra representa 10 μm . (Cortesía de Greta M. Lee, Brian Johnstone, Ken Jacobson y Bruce Caterson.)

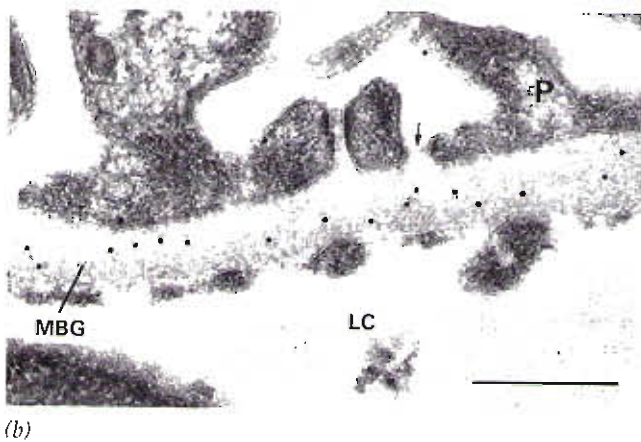
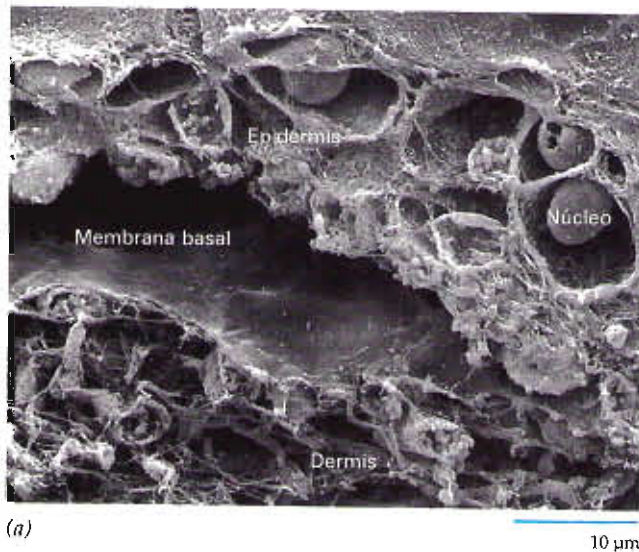


FIGURA 7-3. La membrana basal (lámina basal). *a)* Gammagrafía electrónica de piel humana. La epidermis se ha separado de una parte de la membrana basal, que se puede observar por debajo de las células epidérmicas. *b)* Una membrana basal de espesor poco común se forma entre los vasos sanguíneos del glomérulo y el extremo proximal de los túbulos renales del riñón. Esta capa extracelular desempeña un papel importante para filtrar el líquido expulsado de los capilares hacia el interior de los túbulos renales durante la formación de orina. Los puntos negros dentro de la membrana basal glomerular (MBG) son partículas de oro fijas en los anticuerpos enlazados a moléculas de colágena IV en la membrana basal (LC, luz capilar; P, podocito del túbulo). La barra representa 0.5 μm . (*a*: Cortesía de K. Hollbrook; *b*: según Michael Desjardins y M. Bendayan, J. Cell Biol. 113:695, 1991; con autorización de Rockefeller University Press.)

capilares. Esto tiene particular importancia en el riñón, donde la sangre se filtra a través de la doble membrana basal que separa los capilares del glomérulo de las paredes del túbulo renal (fig. 7-3, *b*). En la diabetes prolongada, la insuficiencia renal puede producir engrosamiento anormal de la membrana basal que rodea al glomérulo. La membrana basal también sirve como barrera contra la invasión de tejidos por células cancerosas errantes.

Las matrices extracelulares más extensas se observan en tejidos conectivos como cartílago, hueso, tendones y el

estroma de la córnea. En estos tejidos, las células que secretan la MEC sólo equivalen a una fracción del volumen tisular. La matriz extracelular, más bien que las propias células, es la que confiere a estos tejidos sus propiedades identificables: dureza para la matriz ósea, resistencia y flexibilidad para la matriz del cartílago, resistencia a la tensión para la matriz del tendón y transparencia para la matriz del estroma corneal.

Aunque la matriz extracelular puede adoptar diferentes formas en diversos tejidos y organismos, los materiales que constituyen la MEC pertenecen a un número relativamente pequeño de familias moleculares; cada una de dichas familias puede contener varias moléculas relacionadas. Iniciaremos aquí con una de las moléculas más importantes y ubicuas de la MEC, la glucoproteína colágena.

Colágena

Las **colágenas** son una familia de glucoproteínas fibrosas que forman parte exclusivamente de matrices extracelulares a las que confieren sus propiedades funcionales. Se observan en todo el reino animal y son notables por su alta resistencia a la tensión, que puede medirse como resistencia a fuerzas de tracción. Las colágenas constituyen la proteína simple más abundante en el cuerpo humano (más de 25% de toda la proteína), hecho que refleja la importancia y amplia distribución de las matrices extracelulares.

La colágena se produce principalmente en los fibroblastos, células presentes en diferentes tipos de tejidos conectivos y en células epiteliales. Hasta ahora se han identificado más de 15 tipos distintos de colágena, algunos descritos en el cuadro 7-1. Cada tipo de colágena se restringe a un sitio particular dentro del cuerpo, pero a menudo hay dos o más diferentes tipos reunidos en la misma MEC. Aunque hay grandes diferencias entre los miembros de la familia de la colágena, todos comparten ciertas características estructurales importantes. Toda molécula de colágena es un trímero que consta de tres cadenas de polipéptidos denominadas cadenas α (fig. 2-33, *a*). Algunos tipos de moléculas de colágena contienen tres cadenas α idénticas, en tanto que otros son heterotrímeros que contienen dos o tres cadenas diferentes. Por ejemplo, una molécula de colágena tipo I consta de dos cadenas $\alpha 1(I)$ y una cadena $\alpha 2(I)$. Cuando menos en una parte de su longitud, las tres cadenas de polipéptidos que forman una molécula de colágena se enredan sobre sí mismas formando una triple hélice característica (estudiada en la página 57).

Numerosas colágenas, incluyendo los tipos I, II y III, se describen como **colágenas fibrilares** debido a que se ensamblan en fibrillas semejantes a cables, que a su vez se ensamblan a fibras más gruesas, de ordinario lo bastante grandes para observarlas con el microscopio de luz. En la figura 2-33, *b*, se muestra el empaque lado a lado de las filas de moléculas de colágena I dentro de una fibrilla de colágena. Las moléculas individuales de colágena no se alinean al mismo nivel en una fibrilla, sino que se escalonan más o menos a la altura de la cuarta parte de la longitud de sus vecinas. Esta disposición escalonada de las moléculas componentes incrementa la resistencia mecánica del complejo y

CUADRO 7-1. Tipos de colágena

Tipo	Cadenas	Estructura	Localización
I	$\alpha 1(I)$, $\alpha 2(I)$	Fibrilar	Piel, tendón, hueso, etc.
II	$\alpha 1(II)$	Fibrilar	Cartilago, humor vítreo
III	$\alpha 1(III)$	Fibrilar	Piel, músculo, etc.
IV	$\alpha 1(IV)$, $\alpha 2(IV)$	No fibrilar	Todas las membranas basales
V	$\alpha 1(V)$, $\alpha 2(V)$, $\alpha 3(V)$	Fibrilar	La mayor parte de los tejidos intersticiales
VI	$\alpha 1(VI)$, $\alpha 2(VI)$, $\alpha 3(VI)$	Fibrilar	La mayor parte de los tejidos intersticiales
VII	$\alpha 1(VII)$	No fibrilar	Fijación de fibrillas
VIII	$\alpha 1(VIII)$	?	Algunas células endoteliales
IX	$\alpha 1(IX)$, $\alpha 2(IX)$, $\alpha 3(IX)$	?	Cartilago
X	$\alpha 1(X)$	?	Cartilago hipertrófico y en etapa de mineralización
XI	$\alpha 1(XI)$, $\alpha 2(XI)$, $\alpha 3(XI)$	Fibrilar	Cartilago
XII	$\alpha 1(XII)$	?	Piel, tendón

Según K. Kuhn, en R. Mayne y R.E. Burgeson, eds. *Structure and Function of Collagen Types*, Academic Press, 1987, p. 2.

produce los patrones de banda característicos de las fibrillas de colágena (fig. 2-33, c). Las fibrillas aumentan todavía más su resistencia mediante uniones covalentes transversales formadas entre lisina e hidroxilisina de moléculas adyacentes de colágena. Cuando se rompen estos enlaces intermoleculares cruzados, como a veces ocurre en animales que ingieren β -aminopropionitrilo, una sustancia tóxica presente en semillas de chícharos dulces, el tejido conectivo puede debilitarse mucho.

Entre los diferentes componentes de la MEC, las moléculas de colágena proporcionan el armazón insoluble que determina muchas de las propiedades mecánicas de la matriz. En realidad, las propiedades de un tejido particular con frecuencia se pueden correlacionar con la organización tridimensional de sus moléculas de colágena. Por ejemplo, los tendones, que conectan los músculos a los huesos, deben resistir tremendas fuerzas de tracción durante los momentos de la contracción muscular. Los tendones contienen una MEC en que las fibras de colágena se alinean paralelas al eje mayor del tendón, y por lo tanto paralelas a la dirección de las fuerzas de tracción. La córnea también es un tejido notable; debe servir como capa protectora durable en la superficie del globo ocular, pero también ser transparente para permitir el paso de la luz a través del cristalino en dirección a la retina. La gruesa capa media de la córnea es el estroma, que contiene fibrillas de colágena relativamente cortas organizadas en distintas capas. La estructura en capas del estroma es similar a la corteza de un árbol; las fibrillas de cada capa son paralelas a las otras fibrillas de la misma capa, pero perpendiculares a las fibrillas de las capas situadas en ambos lados (fig. 7-4). Esta estructura parecida a la corteza de un árbol suministra resistencia a este delicado tejido, en tanto que la uniformidad de tamaño y la disposición de las fibras favorece la transparencia del tejido.

No todas las colágenas forman fibrillas. Una de las colágenas no fibrilares es el tipo IV, cuya distribución se restringe a las membranas basales (pág. 240). Las membranas basales son láminas de apoyo muy delgadas y las moléculas

de colágena tipo IV se organizan formando una red aplanaada que sirve como estructura para el depósito de otros materiales extracelulares. A diferencia de la colágena I, que consta de una triple hélice larga ininterrumpida, los trímeros de la colágena IV contienen segmentos no helicoidales interpuestos a lo largo de la molécula y de los dominios globulares en cada extremo. Los segmentos no helicoidales confieren a la molécula flexibilidad, en tanto que los extremos globulares sirven como sitios de interacción entre moléculas que dan al complejo su carácter tipo reticular (fig. 7-5).

Proteoglicanos

Además de la colágena, las matrices extracelulares típicamente contienen una gran cantidad de un tipo distintivo de



1 μ m

FIGURA 7-4. Estroma corneal. Consta principalmente de capas de fibras de colágena en las cuales las moléculas de capas alternas se disponen en ángulos rectos entre sí, lo que recuerda la estructura de la madera laminada (triplay). (Cortesía de M. Takus.)



FIGURA 7-5. Red de colágena tipo IV de la membrana basal. Micrografía electrónica de una membrana basal del tejido amniótico humano extraído mediante una serie de soluciones salinas para eliminar los materiales no colagenosos. El tratamiento deja una red poligonal muy ramificada de fibras que forman una estructura irregular. Las pruebas indican que esta estructura consta de moléculas de colágena tipo IV entrelazadas en disposición tridimensional compleja. En la figura 7-11 se muestra un modelo del armazón de la membrana basal. (Según Peter D. Yurchenco y George C. Ruben, J. Cell Biol. 105:2561, 1987; © por The Rockefeller University Press.)

complejo proteínico polisacárido denominado **proteoglicano**. Un proteoglicano (fig. 7-6, a) consta de una molécula proteínica central a la cual se unen cadenas de glucosaminoglicanos (GAG) (mostradas en rojo en la figura). Cada cadena de glucosaminoglicano se compone de un disacárido repetitivo; o sea, posee una estructura A-B-A-B-A, donde A y B representan dos azúcares diferentes. Los GAG son muy ácidos debido a la presencia de grupos sulfato y carboxilo unidos a los anillos de los azúcares (fig. 7-6, b).

El papel de la colágena y de los proteoglicanos en la estructura y función de la matriz extracelular se puede ilustrar en el tejido cartilaginoso. El cartilago consta principalmente de una matriz extracelular secretada por condrocitos vivientes que quedan aprisionados en sus propias secreciones (fig. 7-7, a). Las moléculas de colágena forman fibrillas distintas, en tanto que los proteoglicanos constituyen un material amorfo a su alrededor que llena el espacio extracelular (fig. 7-7, b,c). Los proteoglicanos de la matriz cartilaginosa están ensamblados en un complejo gigantesco por la unión de las proteínas centrales a una molécula de ácido hialurónico, un GAG no sulfatado (fig. 7-6, b). En la figura 7-6, c, se muestra el aspecto microscópico de uno de estos complejos que puede ocupar un volumen equivalente a una célula bacteriana.

Debido a las cargas negativas generadas sobre los GAG, los proteoglicanos pueden enlazarse a numerosos cationes,

que a su vez arrastran abundantes moléculas de agua. Como resultado, los proteoglicanos forman un gel poroso hidratado que actúa como "material de empaque" para resistir fuerzas de compresión (aplastamiento). Esta propiedad complementa a la de las moléculas adyacentes de colágena que resisten fuerzas de tracción, y suministran un bastidor de apoyo para los proteoglicanos. En conjunto, colágenas y proteoglicanos suministran al cartilago, y a otras matrices extracelulares, fuerza y resistencia a la deformación. (Se puede obtener una "sensación" de las propiedades mecánicas del cartilago comprimiéndose una oreja o el puente de la nariz.) La matriz extracelular del hueso también se compone de colágena y proteoglicanos, pero se endurece por impregnación de sales de fosfato de calcio.

Una familia de proteoglicanos, los *heparan sulfato proteoglicanos* (HSPG), además de ser el principal componente de la MEC, también desempeñan algunas funciones en la superficie celular (fig. 7-8, a). Los miembros de esta familia incluyen sindecanos, betaglicanos y el CD44. La proteína central de estos proteoglicanos rodea la membrana plasmática, en tanto que los GAG se unen al dominio extracelular de la proteína (fig. 7-8, b). Se cree que el dominio citoplásmico de la proteína central interactúa con el citoesqueleto, y que el dominio extracelular (particularmente el GAG unido a ese extremo de la proteína) interactúa con varias proteínas de la MEC. Además de fijar las células a la MEC, el dominio extracelular del HSPG puede enlazarse a una gran variedad de moléculas difusibles, incluyendo enzimas y factores de crecimiento (fig. 7-8, b).

El HSPG es uno de los diferentes tipos de macromoléculas que forman un puente entre los medios externo e interno de la célula. Como tal, esta molécula se encuentra en posición ideal para transmitir señales a través de la membrana plasmática. Dichas señales pueden influir en muchos aspectos de la conducta de la célula, incluyendo cambios en la morfología celular, motilidad, adherencia, crecimiento y diferenciación de la célula. El papel de los receptores de la superficie celular para transmitir mensajes será explorado con mayor detalle en la página 258 y en el capítulo 15.

Fibronectina, laminina y otras proteínas de la MEC

El término "matriz" implica una estructura formada por una red de elementos que interactúan. Este término es muy adecuado para la matriz extracelular, que además de colágena y proteoglicanos contiene varias proteínas que interactúan entre sí con mucha precisión y de manera definida. La **fibronectina** es una de las proteínas extracelulares mejor estudiadas y revela muchas de las características observadas en la mayor parte de los componentes de otras matrices. Por ejemplo, la fibronectina, igual que otras proteínas de la MEC, contiene una cantidad de dominios distintos, cada uno con funciones particulares (fig. 7-9, a). Cada cadena de polipéptido que forma una molécula de fibronectina contiene:

1. Sitios de enlace para otros componentes de la MEC, incluyendo colágenas y glucosaminoglicanos específicos.

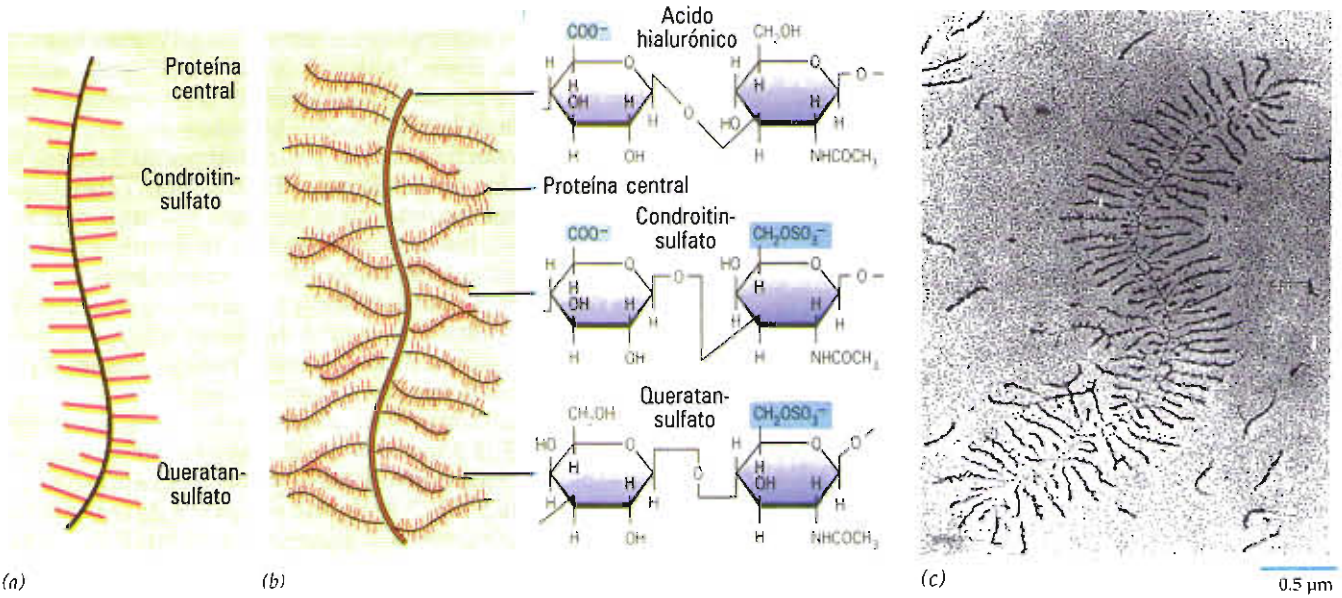


FIGURA 7-6. Estructura de un complejo proteoglicano. *a)* Representación esquemática de un proteoglicano simple que consta de una molécula central de proteína a la cual se unen numerosas cadenas de glucosaminoglicanos (GAG). Los proteoglicanos procedentes de una matriz cartilaginosa contienen cadenas de queratansulfato y de condroitinsulfato cuyas estructuras se muestran en la parte *b*. *b)* En la matriz del cartilago, los proteoglicanos están unidos a un GAG no sulfatado, llamado ácido hialurónico, para formar un complejo gigante. En esta figura se muestran las estructuras de los disacáridos repetitivos que constituyen cada uno de los GAG. Todos los GAG poseen numerosas cargas negativas (indicadas por el sombreado azul). *c)* Micrografía electrónica de un complejo proteoglicano comparable al ilustrado en la parte *b*, aislado de la matriz del cartilago. (*c*: Cortesía de Lawrence C. Rosenberg.)

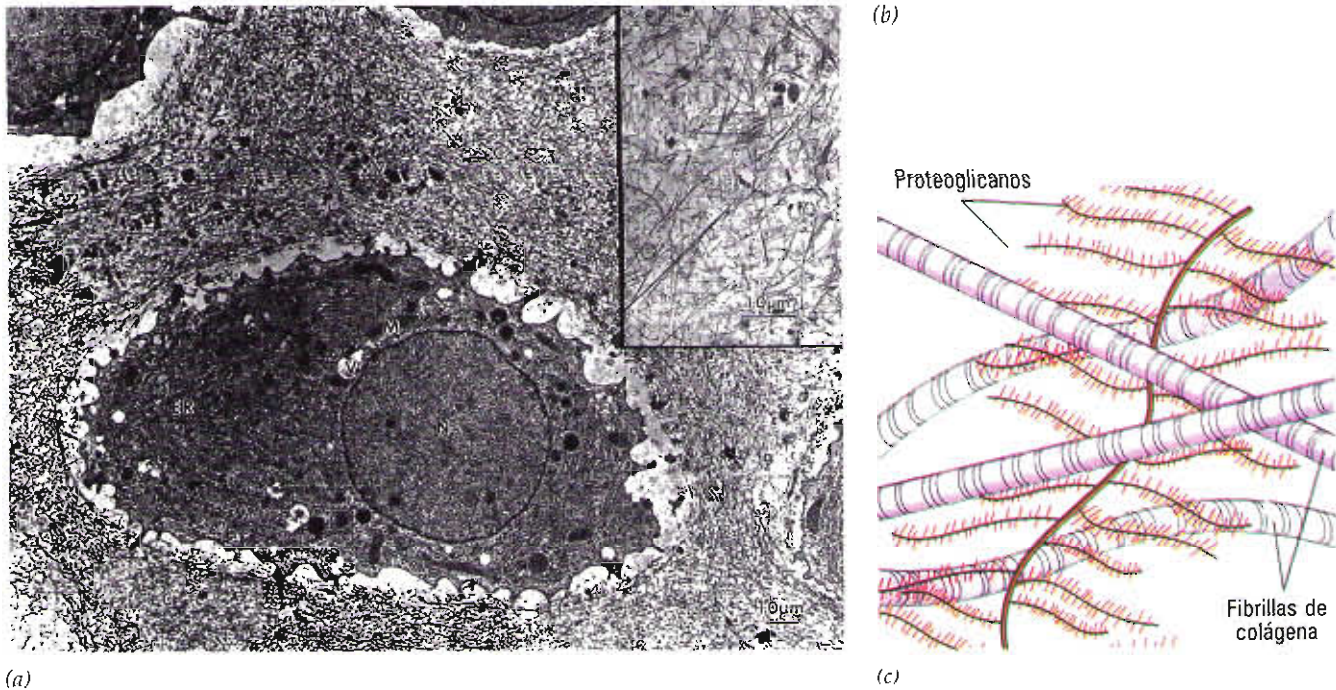


FIGURA 7-7. Estructura del cartilago. *a)* Micrografía electrónica de una sola célula cartilaginosa (condrocito) rodeada por la matriz extracelular que secretan las células (N, núcleo; M, mitocondria; ER, retículo endoplásmico; V, vacuola citoplásmica; MV, vesícula extracelular; C, colágena). *b)* Micrografía de alta resolución que muestra la matriz extracelular. La matriz contiene delgadas fibrillas de colágena tipo II y pequeñas condensaciones electrónicamente densas de proteoglicanos. Los materiales más oscuros y de mayor tamaño son organelos vesiculares que presuntamente contienen materiales de la matriz extracelular. *c)* Diagrama esquemático de la organización aparente de la colágena y del proteoglicano de la matriz del cartilago. (*a,b*: Según Louis C. Gerstenfeld y William J. Landis, *J. Cell Biol.* 112:508-9, 1991; con permiso de Rockefeller University Press.)

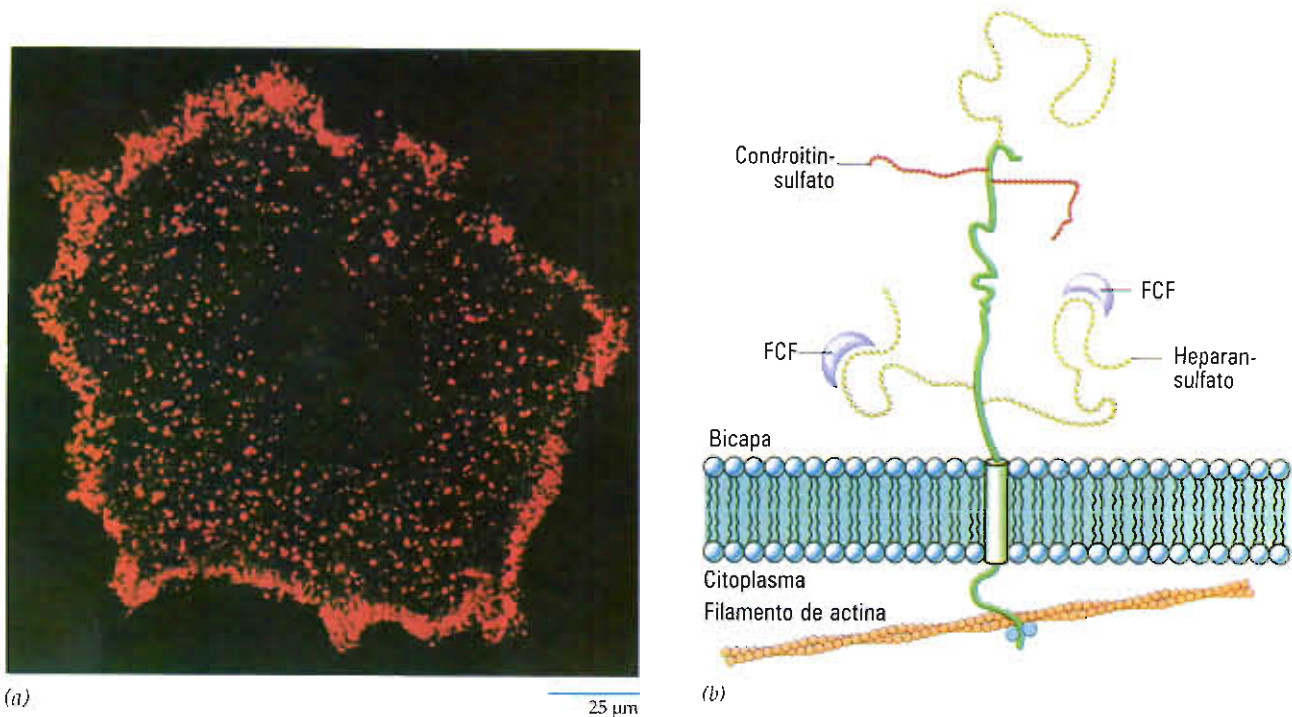


FIGURA 7-8. Proteoglicanos que rodean la membrana. *a)* El sindecano, un proteoglicano que contiene heparansulfato, se localiza en la superficie celular de esta célula de Schwann, según lo revela la unión con anticuerpos antisindecano. *b)* Dibujo esquemático de una molécula sindecano compuesta de una proteína central que abraza a la membrana, en la cual se unen el heparansulfato y los glucosaminglicanos condroitinsulfato extracelulares. Se cree que el dominio citoplásmico de la molécula sindecano interactúa con microfilamentos que contienen actina, en tanto que los GAG extracelulares interactúan con ligandos específicos, como el factor de crecimiento de fibroblastos (FCF). (*a:* Según David J. Carey y cols. *J. Cell Biol.* 124:169, 1994; con permiso de Rockefeller University Press.)

cos, que ayudan a unir estas diversas moléculas en una red estable interconectada.

2. Sitios de enlace para receptores situados sobre toda la superficie de la célula, que sirven para mantener una unión estable entre la MEC y la célula (fig. 7-13).

Desde hace mucho tiempo se emplea fibronectina purificada en cultivo de células para proporcionar a éstas una superficie donde adherirse y crecer.

La importancia de la fibronectina en la MEC es muy evidente cuando los tejidos participan en actividades dinámicas, como las observadas durante el desarrollo embrionario. El desarrollo se caracteriza por oleadas de migración celular que obligan a las células a seguir diferentes rutas de una a otra parte del embrión (fig. 7-10). Muchos estudios indican que las fibrillas con fibronectina a menudo se sitúan en las vías que las células prefieren para desplazarse (fig. 7-9, *b*). Por ejemplo, las células de la cresta neural, que se desplazan afuera del sistema nervioso en desarrollo hacia el interior de casi todas las partes del embrión (fig. 7-10), atraviesan vías ricas en fibronectina. Estos movimientos celulares pueden inhibirse si se inyectan anticuerpos al embrión, que se enlazan a sitios de reconocimiento de las moléculas de fibronectina y los bloquean. La importancia de la fibronectina en el desplazamiento de las células de la cresta neural puede demostrarse fácilmente *in vitro* (fig.

7-9, *c*). No es sorprendente que los ratones que carecen de un gen funcional para fibronectina sean incapaces de sobrevivir después de las primeras etapas del desarrollo embrionario.

Otra glucoproteína de la MEC es la **laminina**, cuyos polipéptidos, igual que los de fibronectina, contienen dominios distintos con sitios de enlace específicos. Además de enlazarse fuertemente a los receptores de la superficie celular, la laminina se puede enlazar a otras moléculas de laminina, a heparansulfato proteoglicanos y a colágena tipo IV, un componente ubicuo de las membranas basales (pág. 242). Se cree que la laminina y las moléculas de colágena del tipo IV se entrelazan con una armazón porosa, como se muestra en la figura 7-11.

Además de su papel estructural, la laminina puede actuar en la capacidad reguladora e influir en el potencial de crecimiento y diferenciación de la célula. La laminina ha sido mejor estudiada en relación con su papel como guía del trayecto de los axones conforme crecen fuera del sistema nervioso central durante el desarrollo embrionario. La laminina está presente a lo largo de muchas de estas vías en el embrión, y cuando aparece sobre la superficie de un cultivo de neuroblastos promueve activamente el desarrollo del axón. El posible papel de la laminina en la diseminación de las células cancerosas se estudia en *La perspectiva humana*, en la página 260.

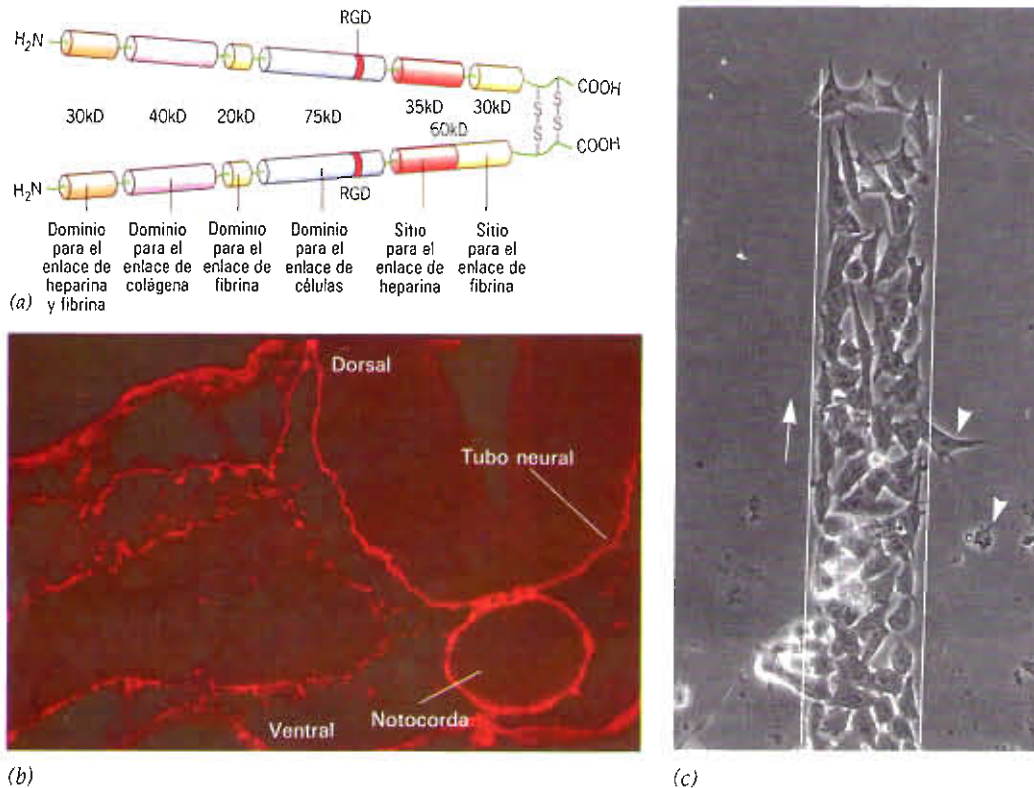


FIGURA 7-9. Estructura y función de la fibronectina. *a)* Una molécula de fibronectina humana consta de dos polipéptidos similares, pero no idénticos, unidos por un par de enlaces disulfuro localizados cerca del C terminal. Cada polipéptido se pliega en algunos dominios estructuralmente distintos que también poseen propiedades funcionales distintas. Lo más importante es que cada dominio contiene uno o más sitios de enlace para componentes específicos de la matriz extracelular o para la superficie de otras células. Algunas de las actividades de enlace se indican por los letreros de los dominios. Se indica el sitio dentro del dominio de enlace celular que contiene la secuencia (arg-gli-asp, o RGD). Según se analiza después en el capítulo, esta secuencia se enlaza específicamente a un tipo particular de proteínas integrales de la membrana plasmática (integrinas) que participan en la unión celular y en la transducción de señales. *b)* Corte a través de un embrión de pollo en etapa temprana tratado con anticuerpos fluorescentes contra fibronectina. La fibronectina se concentra en las membranas basales (sitios rojo oscuro) situadas por debajo del epitelio embrionario y suministran un sustrato sobre el cual migrarán las células. *c)* En esta micrografía, las células de la cresta neural emigran desde una porción del sistema nervioso de pollo en desarrollo (a la izquierda de la fotografía) a un plato de vidrio de cultivo que contiene tiras de una superficie recubierta de fibronectina que alterna con tiras de vidrio descubiertas. La región revestida de fibronectina está indicada por las líneas blancas. Es evidente que las células permanecen exclusivamente sobre las regiones cubiertas de fibronectina. Las células que llegan al sustrato de vidrio (flechas) tienden a redondearse y a perder su capacidad migratoria. La flecha indica la dirección de la migración. (*b*: Cortesía de James W. Lash; *c*: según Giovanni Levi, Jean-Loup Duband y Jean Paul Thery, *Int. Rev. Cytol.* 123:213, 1990.)

Entre otras proteínas de la MEC se incluyen tenascina, entactina y trombospodina. La tenascina es una glucoproteína oligomérica grande que se observa principalmente sobre la superficie de las células embrionarias y varias células tumorales. A diferencia de la fibronectina, que promueve la adherencia celular, la tenascina parece que actúa principalmente como componente antiadherente (fig. 7-2). Sin embargo, los ratones que se desarrollan sin copias de genes funcionales para tenascina no parecen mostrar efectos patológicos por la ausencia de la proteína. La entactina, componente de la membrana basal donde se enlaza a la laminina, puede desempeñar un papel importante en la adherencia y penetración del embrión primitivo de mamífero en el revestimiento del útero durante la implantación. Una gran variedad de células secretan trombospodina en la MEC, y es particularmente prominente en la matriz que rodea el

revestimiento de vasos sanguíneos maduros. En este sitio, la trombospodina parece inhibir la neoformación de vasos sanguíneos (angiogénesis).

La combinación única de los diferentes componentes de la MEC contribuye a las características específicas de cada tipo de tejido. La mayor parte de los componentes de la MEC son grandes macromoléculas compuestas de subunidades con estructura modular y poseen sitios de enlace entre sí. Por consiguiente, las interacciones entre los materiales de la MEC pueden ser muy complejas. Incluso algunas moléculas pueden poseer sitios de enlace con actividades opuestas, por ejemplo, un sitio que promueve la adherencia celular y otro que la inhibe. En estos casos, la organización supramolecular de los diferentes componentes puede determinar en último término el efecto sobre la conducta de la célula, efecto dinámico que puede cambiar de un momento a otro.

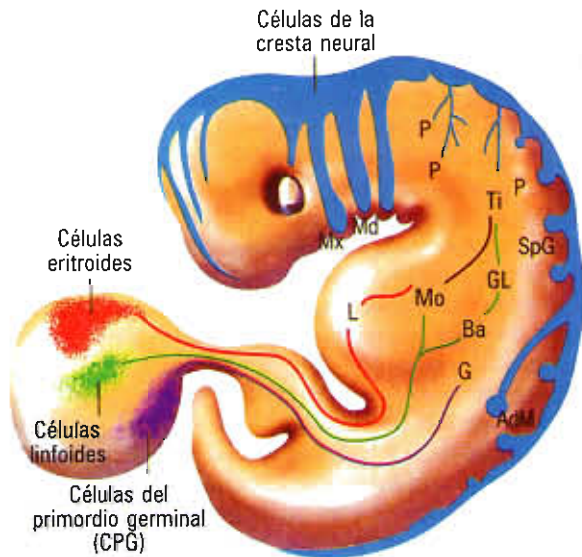


FIGURA 7-10. Resumen de algunos desplazamientos celulares que ocurren durante el desarrollo de un mamífero. Los movimientos más extensos son efectuados por las células de la cresta neural que migran por fuera de la placa neural hacia la línea media dorsal del embrión y originan todas las células pigmentadas de la piel (P), los ganglios simpáticos (SpG), la médula suprarrenal (AdM) y el cartilago del cráneo embrionario (Mx, Md para los arcos maxilar y mandibular). Las células del primordio germinal (CPG) migran desde el saco vitelino al sitio donde se forman las gónadas (G) dentro del embrión. Los progenitores de células linfoides se transportan al hígado (L), médula ósea (Mo), timo (Ti), ganglios linfáticos (GL) y bazo (Ba). (Nota: Las "vías" aquí mostradas conectan los puntos donde se originan las células con su destino; no muestran con precisión la verdadera ruta de las células.) (Según Aaron A. Moscona y R.E. Hausman, en *Cell and Tissue Interactions*, J.W. Lash y M.M. Burger, eds., Raven Press, 1977.)

7-2 Adherencia de células a sustratos no celulares

En el análisis previo hicimos notar que ciertos componentes de la MEC, incluyendo fibronectina, laminina y colágena, tienen capacidad para enlazarse a receptores situados sobre la superficie de la célula. El grupo más importante de receptores que fijan la célula a su microambiente extracelular son las integrinas.

Integrinas

Las **integrinas** son una superfamilia de proteínas integrales de membrana compuestas de cadenas de polipéptidos que abrazan toda la membrana, una cadena α y una cadena β unidas mediante enlaces no covalentes (fig. 7-13). Cuando menos se han identificado 15 diferentes subunidades α y ocho diferentes subunidades β . Teóricamente, pueden existir más de 100 pares posibles de subunidades α y β en forma de heterodímeros, aunque el verdadero número está bastante restringido. En la superficie de la célula sólo se han identificado unas 20 integrinas diferentes, cada una con distribución tisular específica predecible.

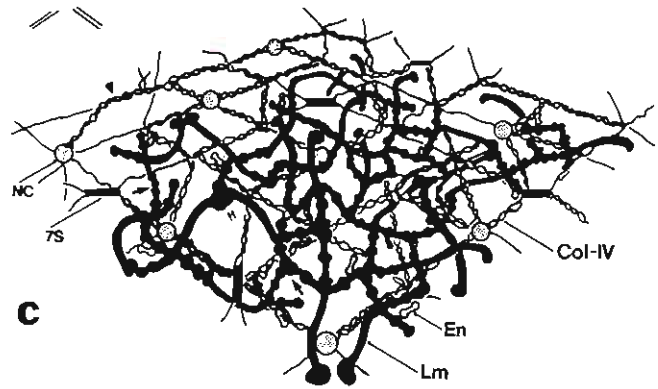


FIGURA 7-11. Modelo de armazón de membrana basal. La disposición de moléculas de colágena tipo IV del armazón de la membrana basal se muestra en la figura 7-5. Aquí también se incluyen otras moléculas que constituyen la membrana basal, principalmente la proteína laminina (Lm), indicada por moléculas engrosadas en forma de cruz, y la entactina (En). (Según Peter D. Yurchenco, Yi-Shan Cheng y Holly Colognato, *J. Cell Biol.* 117:1132, 1992; con permiso de Rockefeller University Press.)

Ambas subunidades de integrina, α y β , poseen una gran porción extracelular donde se encuentran los sitios de enlace para ligandos específicos; un segmento corto, único, que rodea a la membrana, y un pequeño dominio citoplásmico (40 a 50 aminoácidos de largo)¹ que contiene sitios de enlace para componentes del citoesqueleto (fig. 7-18). Por lo tanto, las integrinas tienen capacidad para enlazarse a sustancias en ambos lados de la membrana plasmática. De hecho, el nombre "integrina" concuerda con el concepto de que estas proteínas pueden transmitir señales entre los compartimientos extracelular e intracelular como una manera de "integrar" sucesos externos e internos. Este aspecto de la función de las integrinas se analiza con mayor detalle en la página 258.

En el cuadro 7-2 se presenta una lista de las integrinas conocidas y de los ligandos claves que se unen a ellas. Puesto que las células individuales pueden expresar varias integrinas diferentes en su superficie, dichas células tienen capacidad de enlazarse a distintos componentes extracelulares. En muchos casos, una combinación de integrinas que reconocen diferentes dominios de un ligando extracelular puede ser la que determine el efecto de la MEC sobre la conducta de la célula. Por ejemplo, las células situadas en la capa inferior de la epidermis contienen las integrinas $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$ y $\alpha_5\beta_1$, las cuales pueden ayudar a unir estas células a componentes de la membrana basal subyacente (cuadro 7-2). La liberación de estas células de la membrana basal, requerida para que se desplacen hacia la superficie de la piel, se correlaciona con la pérdida de expresión de las tres integrinas.

La mayor parte de las proteínas extracelulares que se enlazan a las integrinas lo hacen debido a que contienen la

¹ Una excepción a esta arquitectura molecular es la cadena β_4 , que tiene unos 1 000 aminoácidos extra como parte de su dominio citoplásmico. Esta enorme adición hace que las integrinas β_4 puedan extenderse a mucha mayor profundidad dentro del citoplasma (fig. 7-18).



FIGURA 7-12. Experimento que demuestra la acción antiadherente de la tenascina. Antes de añadir las células, se aplicaron las proteínas fibronectina y tenascina a la superficie del plato de cultivo, según se escriben sus respectivos nombres. Aunque las células permanecieron a baja densidad sobre el plato, se concentraron sobre las partes que contenían fibronectina evitando los sitios con tenascina, que permanecen vacíos. (Según Ruth Chiquet-Ehrismann, Curr. Opin. Cell Biol. 3:801, 1991.)

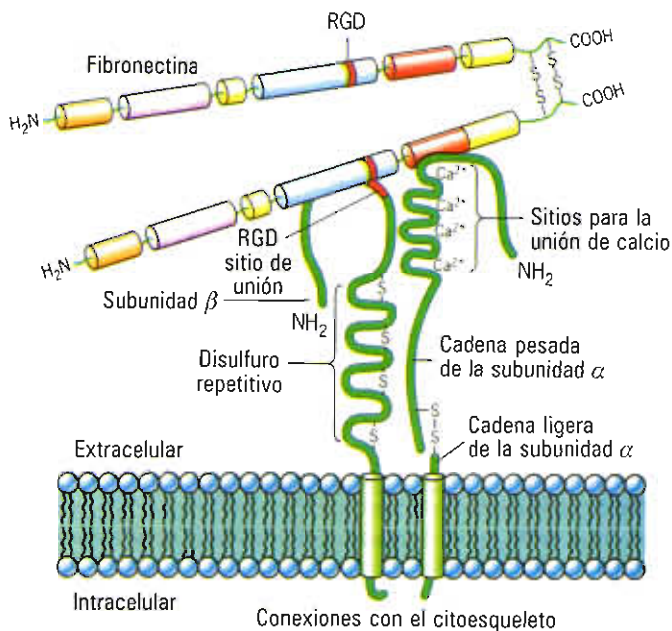


FIGURA 7-13. Estructura y funciones de las integrinas. Esquema de un heterodímero integrina tal como reside en la superficie de las células. La masa de cada subunidad se localiza en el lado extracelular de la membrana. La subunidad β mostrada aquí contiene los sitios de enlace RGD que reconocen fibronectina y otros materiales extracelulares. Los iones calcio, requeridos para la actividad de enlace de integrinas, se unen a cuatro motivos enlazados a cationes sobre la subunidad α . Ambas subunidades atraviesan la bicapa de lípidos de la membrana como una sola hélice α .

secuencia de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico (o, en la nomenclatura abreviada de aminoácidos, RGD). Esta secuencia de tripéptidos se presenta en los sitios de enlace de la célula de fibronectina, laminina y colágena, y de otras proteínas extracelulares. En la figura 7-14 se muestra el dominio de enlace de la célula de fibronectina, con su asa que contiene RGD. El sitio de enlace de RGD sobre la molécula de integrina se indica en la figura 7-13.

Como ya se mencionó, muchas células se adhieren firmemente a un plato de cultivo recubierto con fibronectina. Si las células se añaden en presencia de un péptido sintético que contiene la secuencia RGD, la célula ya no puede unirse al plato de cultivo; el péptido sintético tiene capacidad para competir con éxito con las secuencias RGD de las moléculas de fibronectina por los sitios de enlace sobre las integrinas de la superficie celular. Se estima que casi la mitad de todas las integrinas contienen sitios de enlace de RGD (como las mostradas en la columna de la izquierda del cuadro 7-2). Por consiguiente, las proteínas extracelulares específicas son capaces de enlazarse a varios miembros diferentes de la familia de las integrinas, y viceversa. Dada esta redundancia y el hecho de que la afinidad de las integrinas por sus ligandos puede variar según condiciones locales, el tema de las interacciones integrina-ligando es complicado y todavía no comprendido en su totalidad. El enlace de todos los ligandos a las integrinas, sea por secuencias RGD u otras secuencias, requiere la presencia de iones bivalentes, ya sea Mg^{2+} o Ca^{2+} . Los sitios de enlace para cationes bivalentes sobre la subunidad α se indican en la figura 7-13.

El descubrimiento de la importancia de la secuencia RGD en la actividad de la integrina planteó la posibilidad de nuevos tratamientos para padecimientos que afectan la superficie celular. La formación de un coágulo sanguíneo (*trombo*) en un vaso no dañado puede interrumpir el flujo de sangre a través de órganos vitales y es una de las principales causas de ataque al corazón y accidente vascular cerebral. Uno de los primeros pasos en la formación de un coágulo sanguíneo es la agregación de plaquetas, fragmentos celulares no nucleados que circulan en la sangre. La agregación de plaquetas requiere la interacción de una integrina específica de plaquetas ($\alpha_{IIb}\beta_3$) con proteínas solubles de la sangre que contengan RGD, como el fibrinógeno y el factor de von Willebrand, que actúan como uniones para mantener juntas a las plaquetas (fig. 7-15). Experimentos con animales indican que péptidos sintéticos provistos de RGD pueden inhibir la coagulación de la sangre y son agentes antitrombóticos eficaces en el ser humano. Es evidente que estos agentes deben administrarse con sumo cuidado, puesto que pueden interferir con muchos otros procesos mediados por integrinas. Esto puede ilustrarse con una familia de toxinas presentes en el veneno de ciertas serpientes que contienen proteínas con secuencias RGD. Estas toxinas actúan al impedir el enlace a integrinas (por esa razón se les denomina *desintegrinas*).

Además de su papel en el enlace a materiales extracelulares y la transmisión de señales a través de la membrana plasmática, las integrinas también participan en la formación de dos tipos de estructuras adherentes especializadas: adherencias focales y hemidesmosomas.

CUADRO 7-2. Clasificación de los receptores de integrina según el reconocimiento de las secuencias RGD

RGD reconocidas		RGD no reconocidas	
Receptor de integrina	Ligandos clave	Receptor de integrina	Ligandos clave
$\alpha_3\beta_1$	Fibronectina	$\alpha_1\beta_1$	Colágena
$\alpha_5\beta_1$	Fibronectina	$\alpha_2\beta_1$	Colágena Laminina
$\alpha_v\beta_1$	Fibronectina	$\alpha_3\beta_1$	Colágena Laminina
$\alpha_M\beta_2$	Leishmania	$\alpha_4\beta_1$	Fibronectina MACV
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibrinógeno	$\alpha_6\beta_1$	Laminina
	Fibronectina	$\alpha_L\beta_2$	ICAM-1 ICAM-2
	Factor von Willebrand		
	Vitronectina	$\alpha_M\beta_2$	Fibrinógeno ICAM-1
$\alpha_v\beta_3$	Fibrinógeno		
	Fibronectina		
$\alpha_v\beta_5$	Factor von Willebrand		
	Vitronectina		
$\alpha_v\beta_6$	Fibronectina		

FUENTE: S.E. D'Souza, M.H. Ginsberg y E.F. Plow, *Trends in Biochem. Sci.* 16:249, 1991.



FIGURA 7-14. Uno de los módulos de una molécula de fibronectina que contiene el motivo RGD. Los tres aminoácidos (arg-gli-asp) que constituyen el motivo (mostrado en amarillo) sirven como sitio de reconocimiento común entre proteínas extracelulares en los receptores de enlace sobre la superficie celular. El motivo RGD se sitúa en el vértice de un asa del polipéptido, sobresaliendo del módulo. (Según Alison L. Main y cols. *Cell* 71:674, 1992; con permiso de Cell Press.)

Adherencias focales y hemidesmosomas: fijación de células a su sustrato

Es mucho más fácil estudiar la interacción de las células con la parte inferior de un plato de cultivo que con una matriz extracelular de un animal. Por consiguiente, gran parte de nuestro conocimiento en esta área se obtuvo del estudio de células que se adhieren *in vitro* a diferentes sustratos. Las etapas que ocurren durante la fijación de una célula a la superficie del plato de cultivo se muestran en la figura 7-16. Al principio, la célula tiene forma esférica, como generalmente ocurre en células suspendidas en medios acuosos. Una vez que la célula entra en contacto con el sustrato envía hacia afuera prolongaciones que forman uniones cada vez más estables. Con el tiempo, las células se aplanan y extienden sobre sí mismas hacia afuera del sustrato. La expansión se acompaña de un cambio espectacular en la organización del citoesqueleto, tal vez mediada por un mecanismo de señales transmembrana que comunica el citoplasma con el medio externo.

Cuando los fibroblastos o las células epiteliales se propagan hacia la superficie inferior de un plato de cultivo, la parte de abajo de la célula no se comprime uniformemente contra el sustrato. En vez de ello, la membrana celular entra en estrecho contacto (casi 10 nm) con la superficie del plato sólo en sitios discretos, dispersos, llamados **contactos focales** (o *adherencias focales*). En la región de contacto focal, la membrana plasmática contiene grupos de integrinas (con mayor frecuencia $\alpha_5\beta_1$) que conectan el material extracelular que reviste el plato de cultivo con el sistema de microfilamentos del citoesqueleto que contiene actina (fig. 7-17).

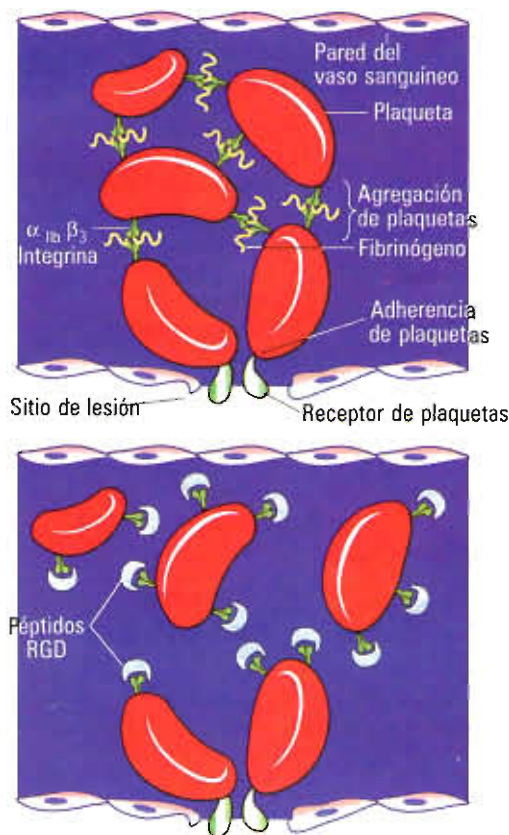
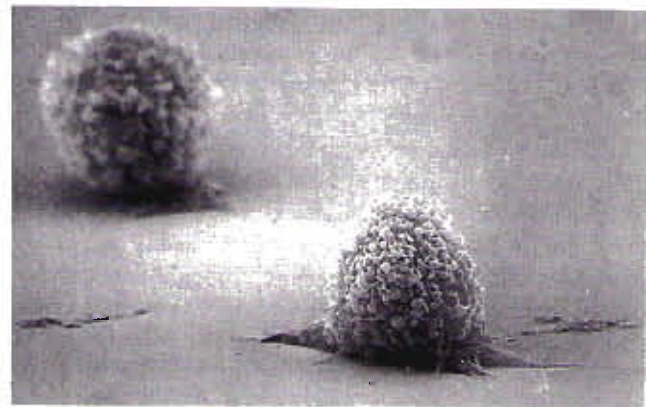


FIGURA 7-15. Los coágulos sanguíneos se forman cuando las plaquetas se adhieren entre sí a través de puentes de fibrinógeno enlazados a las integrinas de las plaquetas. La presencia de péptidos RGD sintéticos puede inhibir la formación del coágulo sanguíneo al competir con las moléculas de fibrinógeno por los sitios de enlace RGD sobre las integrinas.

La presencia de contactos focales guarda relación inversa con el movimiento de la célula sobre el sustrato; cuanto mayor sea el número de contactos focales, menos movable será la célula.

Los contactos focales son estructuras adherentes características de células cultivadas adheridas a la superficie del plato de cultivo. En el interior del cuerpo se observan uniones firmes entre células y la matriz celular a nivel de la superficie basal de las células epiteliales, donde se unen a la membrana basal subyacente mediante una estructura adherente especializada denominada **hemidesmosoma** (fig. 7-18). Los hemidesmosomas consisten en una placa densa situada en la superficie interna de la membrana plasmática con filamentos que corren al interior del citoplasma. A diferencia de los filamentos de los contactos focales, que contienen actina, los filamentos del hemidesmosoma son más gruesos y contienen queratina. Los filamentos que contienen queratina se clasifican como filamentos intermedios, que sirven principalmente para funciones de apoyo; se distinguen de los microfilamentos más delgados que contienen actina y cuya función es contráctil (los dos tipos de filamentos se estudian con detalle en el capítulo 9). Los fi-



(a)

2.5 μm



(b)

2.5 μm



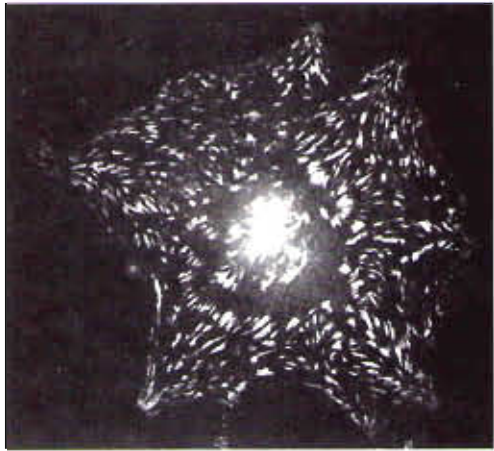
2.5 μm



(d)

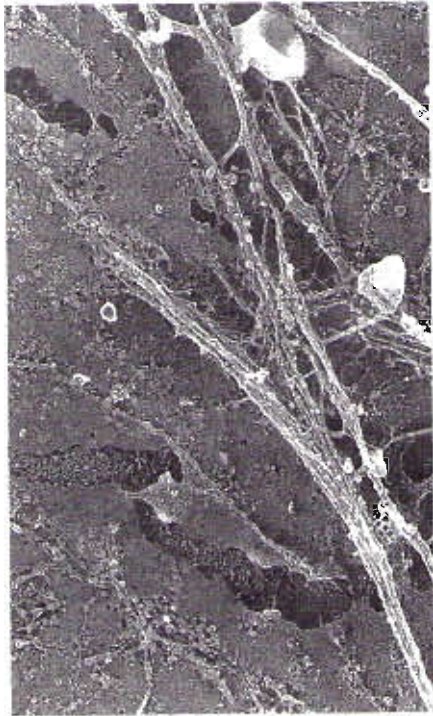
2.5 μm

FIGURA 7-16. Pasos en el proceso de propagación celular. Gamagrafía electrónica que muestra la morfología de los fibroblastos de ratón en momentos sucesivos durante la unión y propagación sobre el cubreobjetos de vidrio. Las células se fijaron después de: a) 30 minutos, b) 60 minutos, c) dos horas y d) 24 horas de la unión. (Según J.I. Rosen y L.A. Culp, Exp. Cell Res. 107:141, 1977.)



(a)

10 μm



(b)

2.5 μm

FIGURA 7-17. Los contactos focales son sitios donde las células se adhieren a su sustrato. *a)* Este fibroblasto que se adhiere a un plato de cultivo revestido de fibronectina fue teñido con anticuerpos fluorescentes para revelar la localización de la integrina $\alpha_5\beta_1$. Se observó que la integrina se localiza en pequeñas placas que corresponden a los sitios de contacto focal. *b)* Aquí se muestra la superficie citoplásmica de un contacto focal en una célula cultivada de anfibio luego de procesar la superficie interna de la membrana por congelamiento rápido y “aguafuerte” profundo. Se observa que los haces de microfilamentos se asocian a la superficie interna de la membrana en la región de un contacto focal. (*a*: Según William G. Carter, Elizabeth A. Wayner, Todd S. Bouchard y Pritinder Kaur, J. Cell Biol. 110:1389, 1990; *b*: según Steven J. Samuelsson, Paul J. Luther, David W. Pumphlin, Robert J. Bloch, J. Cell Biol. 122:487, 1993; ambos con permiso de Rockefeller University Press.)

lamentos de queratina del contacto focal se unen a la matriz extracelular mediante integrinas que rodean a la membrana, incluyendo $\alpha_6\beta_4$. La importancia de los hemidesmosomas se puede apreciar en una rara enfermedad, el *pénfigo bulloso*, en el cual se producen anticuerpos que se enlazan a una proteína presente en estas estructuras adherentes. Las enfermedades causadas por anticuerpos dirigidos contra nuestros propios tejidos se denominan *enfermedades autoinmunitarias* y son causa de una gran variedad de padecimientos. En casos de *pénfigo bulloso*, los anticuerpos se enlazan a una proteína (*antígeno penfigoide bulloso*) localizada en las placas de los hemidesmosomas. Esto causa que la capa inferior de la epidermis se separe de la membrana basal subyacente (y por lo tanto de la capa de tejido conectivo de la dermis). El paso de líquido al espacio situado debajo de la epidermis provoca graves ampollas en la piel.

7-3 Adherencia de células a otras células

El examen de un delgado corte transversal que pase por los principales órganos revela una compleja arquitectura que implica diversos tipos de células. La formación de estos complicados patrones celulares tridimensionales dentro de los órganos en desarrollo sin duda depende principalmente de interacciones de tipo *selectivo* entre células similares y no similares. Las pruebas indican que las células pueden reconocer la superficie de otras células porque “saben” con cuáles deben interactuar y a cuáles deben ignorar.

Es muy difícil estudiar las interacciones de adherencia que ocurren en las partes microscópicas de órganos minúsculos conforme se desarrollan en el embrión. Los primeros intentos para aprender algo acerca de cómo las células se reconocen y adhieren entre sí se llevaron a cabo al eliminar un órgano en desarrollo de un embrión, disociando el tejido para formar una suspensión de células únicas y determinando la capacidad de las células para reagruparse en cultivo. En experimentos donde se disociaron y mezclaron células de dos órganos diferentes en desarrollo, inicialmente se aglutinaron para formar una masa mixta. Sin embargo, con el tiempo, las células se desplazaron dentro del agregado y se “autoclasificaron”, de modo que cada célula sólo se adhiere a células de su mismo tipo (fig. 7-19).

Un método experimental diferente, ilustrado en la figura 7-20, *a*, también demuestra que las células de preferencia tienden a adherirse a otras células de su mismo tipo. En este estudio, células en suspensión marcadas con isótopos radiactivos se añadieron a un plato de cultivo cuya superficie estaba cubierta por una monocapa de células, y se permitió que las células marcadas se asentaran sobre la monocapa durante cierto tiempo; a continuación se lavó el plato para liberarlo de células no adheridas y se midió la radiactividad producida por las células adheridas al plato. En experimentos de este tipo, generalmente se observa que el número de células marcadas adheridas al plato es mucho mayor si las células inmóviles de la monocapa son del mismo tipo que las células en suspensión comparadas con células de diferente tipo (fig. 7-20, *b*).

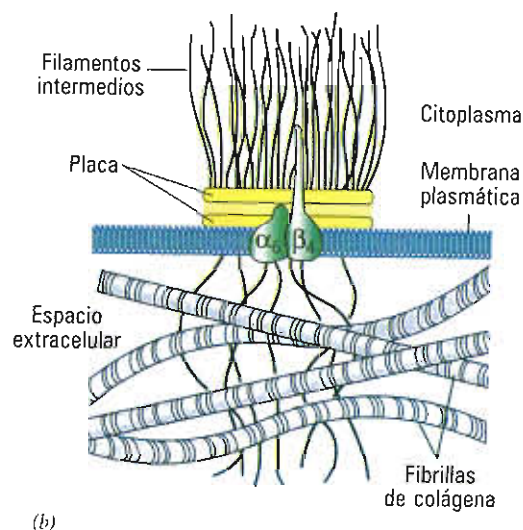
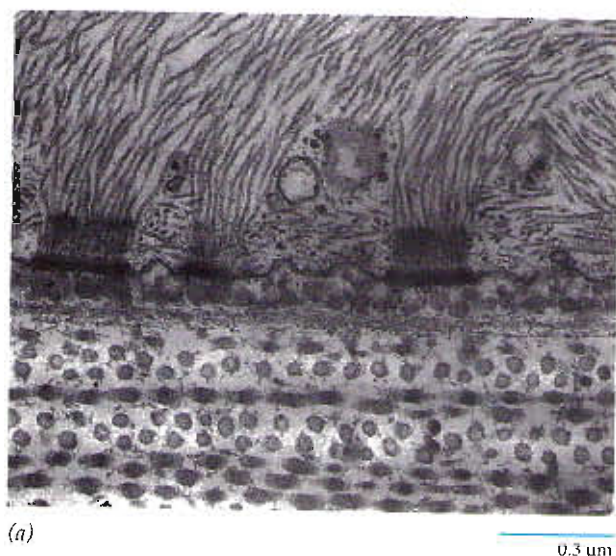


FIGURA 7-18. Los **hemidesmosomas** son sitios diferenciados de la superficie basal de las células epiteliales donde las células se fijan a la membrana basal subyacente. *a)* Micrografía electrónica de varios hemidesmosomas mostrando la placa densa sobre la superficie interna de la membrana plasmática y los filamentos intermedios que se proyectan al interior del citoplasma. *b)* Diagrama que muestra los principales componentes de un hemidesmosoma. (*a:* Según Douglas E. Kelly, *J. Cell Biol.* 28:51, 1966; con permiso de Rockefeller University Press.)

Poco se sabía sobre la naturaleza de las moléculas que median la adherencia entre células hasta el desarrollo de técnicas para purificar proteínas integrales de membrana y, más recientemente, aislamiento y clonación de los genes que codifican estas proteínas. Hasta ahora se ha demostrado que cuatro distintas familias de proteínas de membrana median la adherencia de una célula a otra: 1) selectinas; 2) ciertos miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF); 3) ciertos miembros de la superfamilia de las integrinas, y 4) cadherinas.

Selectinas

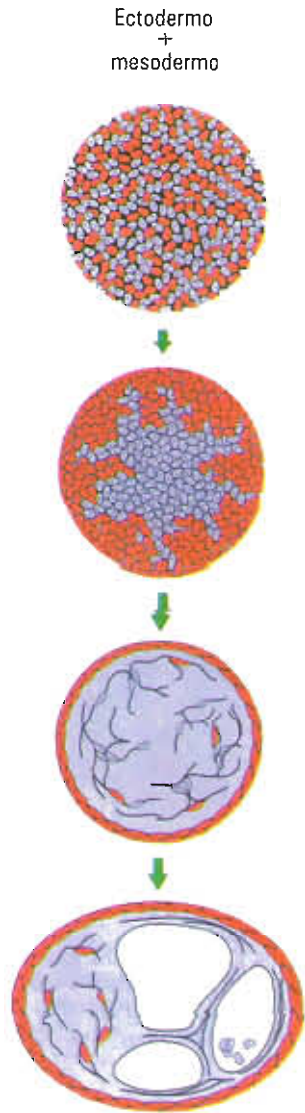
Durante el decenio de 1960 se descubrió que los linfocitos eliminados de ganglios linfáticos periféricos, marcados con isótopos radiactivos e inyectados de nuevo al cuerpo, retornaban a sus sitios de origen, fenómeno denominado "regreso a casa de los linfocitos". Posteriormente se observó que el regreso a casa podía estudiarse *in vitro* al permitir que los linfocitos se adhirieran a cortes congelados de tejido linfoide. En estas condiciones experimentales los linfocitos se adhieren selectivamente al revestimiento endotelial de las vénulas (las venas más pequeñas) de los ganglios linfáticos periféricos. La unión de linfocitos a vénulas podía impedirse con anticuerpos que se enlazan a una glucoproteína específica sobre la superficie del linfocito. Este receptor de linfocitos se denominó LEU-CAM1 y posteriormente selectina-L.

Las **selectinas** son una familia de glucoproteínas integrales de membrana que reconocen disposiciones específicas de grupos carbohidrato proyectados de la superficie de otras células y se unen a ellos. El nombre de este tipo de receptor de la superficie celular se deriva de la palabra "lectina", término que describe un compuesto capaz de enlazarse

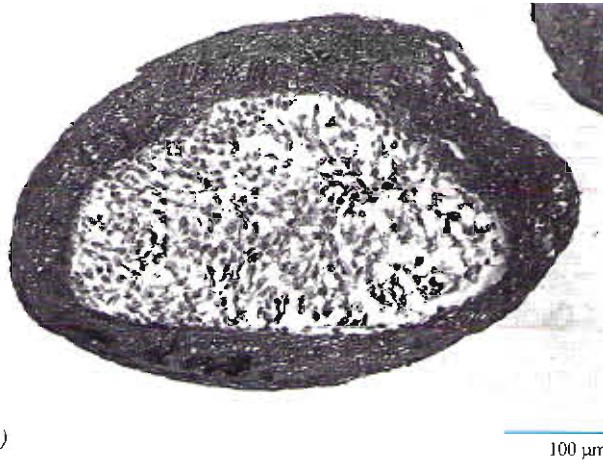
a grupos carbohidrato específicos. Las selectinas poseen un pequeño dominio citoplásmico, un dominio simple que rodea a la membrana, y un gran segmento extracelular que consta de algunos dominios separados, incluyendo el más externo que actúa como lectina (fig. 7-21, *a*). Se conocen tres selectinas: selectina E, que se expresa en las células endoteliales; selectina P, expresada sobre plaquetas y células endoteliales, y selectina L, que se expresa en todo tipo de leucocitos (glóbulos blancos de la sangre). Estas tres selectinas reconocen un grupo similar de cuatro azúcares (fig. 7-21, *a,b*) presente en los extremos de ciertas cadenas de carbohidratos de glucoproteínas o glucolípidos. El enlace de selectinas a sus ligandos carbohidrato depende de calcio. Como grupo, las selectinas median interacciones transitorias entre leucocitos circulantes y la pared vascular en sitios donde hay inflamación y coagulación. El papel de la selectina P se analiza en *La perspectiva humana: Papel de la adherencia celular en la inflamación y la metástasis*.

Inmunoglobulinas e integrinas

Una de las piedras angulares en el conocimiento de la respuesta inmunológica (pág. 62) fue el descubrimiento, en los años 1960, de la estructura molecular de los anticuerpos de origen sanguíneo (IgG). Se observó que las moléculas de anticuerpos constan de una cadena de polipéptidos compuesta de varios dominios similares. Cada dominio Ig, como se le llamó, se compone de 70 a 110 aminoácidos organizados en una estructura firmemente plegada que se muestra en las figuras 2-43 y 2-44. Con el tiempo, fue evidente que los dominios de tipo Ig se encuentran en gran variedad de proteínas que en conjunto constituyen la **superfamilia de las inmunoglobulinas**, o IgSF. La mayor parte de los miem-

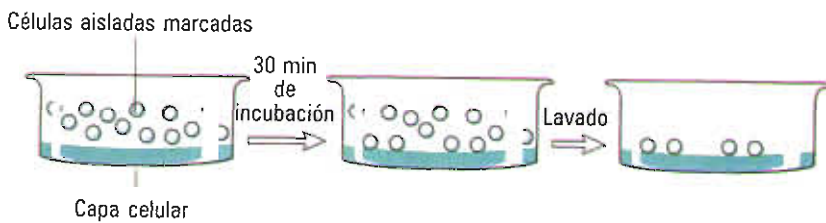


(a)

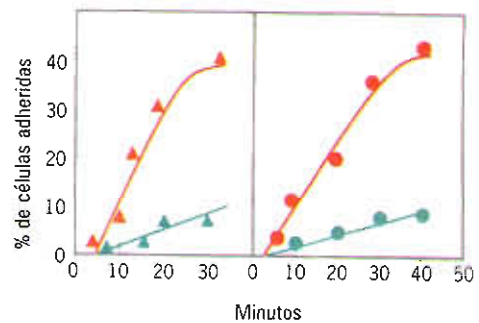


(b)

FIGURA 7-19. Demostración experimental del reconocimiento célula a célula. Los tejidos de los órganos embrionarios se pueden disociar en células únicas tratando brevemente el tejido con una enzima proteolítica o eliminando los iones calcio del medio en el cual se encuentra suspendido el tejido. Cuando se disocian células de dos tipos de órganos embrionarios y después se mezclan, las células de los dos órganos se agregan y luego se "autoclasican" por asociación con otras células del mismo tipo. Aquí se muestran los resultados de dos experimentos de este tipo. *a)* En este experimento se disociaron en células aisladas y luego se volvieron a combinar las células de dos regiones del embrión temprano de un anfibio (ectodermo y mesodermo en etapa de gástrula). Al principio las células forman un agregado mixto, pero con el tiempo se clasifican. Las células ectodérmicas se desplazan hacia la superficie externa del agregado, sitio donde se localizan en el embrión, y las células mesodérmicas se desplazan al interior, posición que ocuparán en el embrión. A continuación, ambos tipos de células se diferencian en estructuras del tipo al que normalmente darían lugar. *b)* Micrografía con microscopio de luz que muestra los resultados de un experimento en el cual se mezclaron células precartilaginosas de un embrión de pollo con células del ventrículo cardíaco del mismo animal. Los dos tipos de células se han autoclasificado saliendo del agregado mixto; las células del corazón forman una capa en el lado externo de las células precartilaginosas. (*a:* Según P.L. Townes y Johannes Holtfreter, J. Exp. Zool. 128:53, 1955; *b:* según Malcolm S. Steinberg, J. Exp. Zool. 173:411, 1970.)



(a)



(b)

FIGURA 7-20. Protocolo experimental para medir la adherencia de célula a célula. *a)* En este estudio se vierte sobre una capa de células una suspensión de células marcadas con isótopos radiactivos. La tasa de adherencia se determina incubando las células a tiempos diferentes, lavando las células no adheridas y midiendo la radiactividad procedente de las células restantes unidas a la monocapa celular. *b)* Cinética de la adherencia de células a una monocapa del mismo tipo de células (línea roja) o a células de tipo diferente (línea azul). El experimento mostrado compara la interacción de células de teratoma de ratón y células de riñón de ratón en dos combinaciones recíprocas. (*b:* Según B.T. Walther, R. Ohman y S. Roseman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70:1569, 1973.)

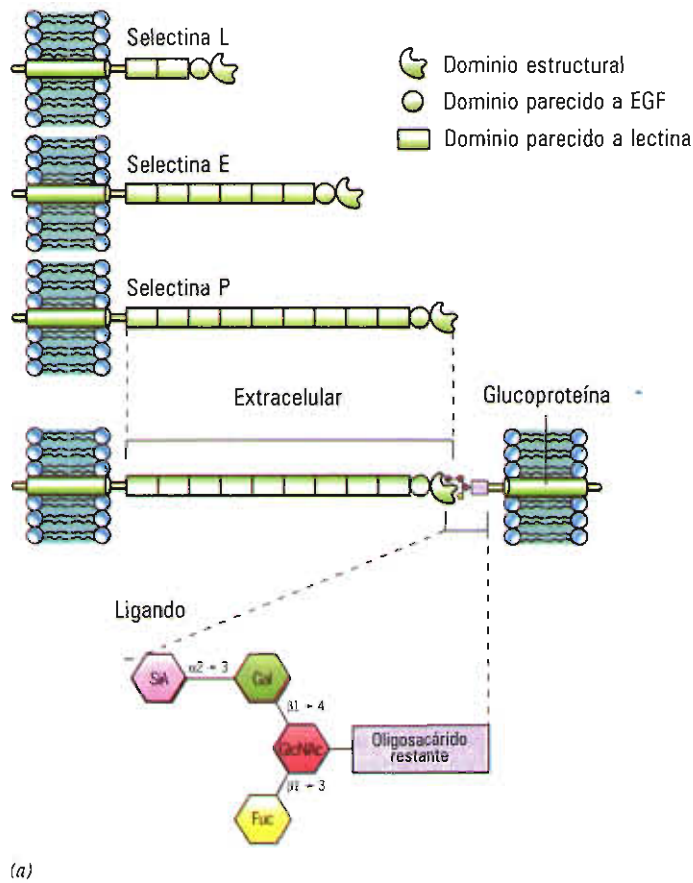


FIGURA 7-21. Selectinas. Estas moléculas de adhesión celular reconocen muchos carbohidratos específicos en los extremos de cadenas de oligosacáridos, glucolípidos y glucoproteínas. *a)* Esquema de los tres tipos de selectinas y del carbohidrato ligando al cual se enlazan. *b)* Modelo del dominio selectina E de una lectina. Los residuos en amarillo son aquellos cuya mutación disminuyó de manera significativa el enlace de la proteína con su ligando. El ligando (sLe*) reconocido por la selectina E se muestra en color verde a un lado de la proteína, orientada como si estuviera lista para enlazarse al dominio lectina de la proteína. Los grupos rojos del ligando indican las fracciones carbohidrato que son cruciales para el enlace de la selectina E; estas incluyen los grupos carboxilo del ácido siálico, dos grupos hidroxilo de galactosa y tres grupos hidroxilo de fructosa. La barra representa 10 Å. (*b.* Según David V. Erbe y cols. *J. Cell Biol.* 119:224, 1992, cortesía de Laurence A. Laskey; con permiso de Rockefeller University Press.)

bro de las IgSF son proteínas integrales de membrana presentes en la superficie de los linfocitos que participan en diferentes etapas de la función inmunológica. Algunas de estas proteínas integrales median la adhesión célula-célula *independiente* de calcio. En realidad, el descubrimiento de dominios semejantes a Ig en moléculas que participan en la adhesión celular en los invertebrados, animales que carecen de un sistema inmunológico típico, sugiere que originalmente las proteínas similares a Ig evolucionaron a partir de mediadores de la adhesión celular y sólo en forma secundaria adquirieron funciones como efectores del sistema inmunológico de los vertebrados.

La mayor parte de las moléculas IgSF de adhesión celular median interacciones específicas de linfocitos con células (p. ej., macrófagos, otros linfocitos y células blanco) requeridas para la respuesta inmunológica. Sin embargo, algunos miembros IgSF, como moléculas de adhesión a células neurales (MACN) median la adhesión entre células no inmunológicas, incluyendo células nerviosas y mus-

culares embrionarias. A partir del modelo de la molécula MACN mostrado en la figura 7-22, es evidente que igual que fibronectina y muchas otras proteínas implicadas en la adhesión celular, las moléculas IgSF para la adhesión de células poseen una estructura modular constituida por dominios individuales compartidos con otras proteínas. Las moléculas de adhesión a células neurales participan en diferentes etapas del desarrollo del sistema nervioso, incluyendo agregación de células migrantes de la cresta neural para formar agregados que posteriormente se desarrollan como ganglios simpáticos (fig. 7-10), interacción estrecha entre células nerviosas y células de sostén que las rodean, y en la formación de contactos sinápticos entre células nerviosas y sus células específicas. Por ejemplo, si se inyectan anticuerpos contra MACN en un embrión de pollo en desarrollo, se puede interrumpir cada uno de estos procesos.

Diferentes tipos de proteínas sirven como ligandos para las moléculas IgSF de la superficie celular. Una proteína IgSF sobre una célula puede enlazarse a la misma proteína

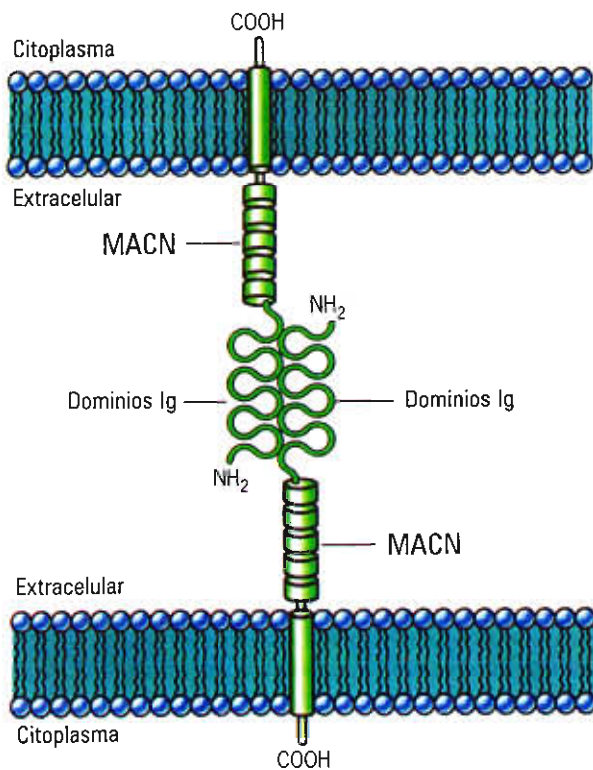


FIGURA 7-22. Moléculas de adhesión de células de la superfamilia Ig. Representación esquemática de la adhesión de célula a célula resultante de interacciones específicas entre dominios Ig de dos moléculas de adhesión a células neuronales que se proyectan desde la superficie de células vecinas. Cada molécula de adhesión a células neuronales contiene un pequeño dominio citoplásmico, un segmento transmembrana, varios segmentos que recuerdan los segmentos repetidos observados en la fibronectina y seis dominios Ig situados en la porción N terminal de la molécula.

IgSF o a una diferente sobre otra célula. Por ejemplo, una molécula MACN sobre una célula puede enlazarse al mismo tipo de MACN sobre otra célula (fig. 7-22). Según se describió antes, la mayor parte de las integrinas facilitan la adhesión de células con su sustrato, pero unas pocas integrinas median la adhesión de una célula con otra al enlazarse a proteínas IgSF en células opuestas. Por ejemplo, la integrina $\alpha_4\beta_1$ en la superficie de los leucocitos se une a la molécula de adhesión a células vasculares (MACV), una proteína IgSF de la superficie de células endoteliales (fig. 7-28).

Cadherinas

Las cadherinas son una familia de cuando menos 12 glucoproteínas relacionadas que median la adhesión celular dependiente de Ca^{2+} . Los miembros de la familia de las cadherinas se pueden distinguir entre sí por el tipo de células en las cuales se presentan; los miembros mejor estudiados son: cadherina E (epitelial), cadherina N (neural) y

cadherina P (placentaria). Estas cadherinas contienen un segmento extracelular relativamente grande que consta de cuatro dominios, un segmento único transmembrana y un dominio citoplásmico único. Las cadherinas se unen a células similares entre sí y de manera preferencial a la misma cadherina presente en la superficie de la célula vecina (fig. 7-23). Esta propiedad de autoasociación se puede demostrar en células manipuladas por ingeniería genética para que expresen una variedad de las diferentes cadherinas, y luego mezclar las células en diferentes combinaciones. Cuando se efectúa este experimento, las células que expresan una especie de cadherina se adhieren preferencialmente a otras células que expresan la misma cadherina. La capacidad de las cadherinas para mediar la adhesión de células semejantes puede explicar los resultados de los primeros estudios, como el que se muestra en la figura 7-19, en el cual las células de agregados mixtos “se clasificaron” para formar agrupamientos de células de tipo similar. En realidad, las cadherinas pueden ser el factor aislado más importante para mantener las células reunidas en tejidos firmemente cohesivos.

El desarrollo embrionario se caracteriza por cambios en la expresión del gen, en la forma de la célula, en la motilidad celular, en la adhesión de células, y así sucesivamente. Las cadherinas desempeñan un papel clave en algunos de estos cambios. Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario algunos sucesos morfogénicos implican cambiar un grupo de células de un mesénquima (células laxas

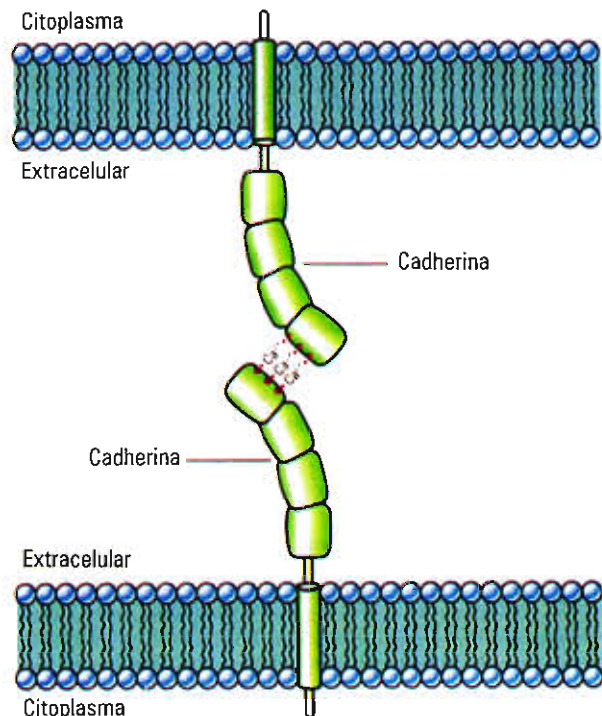


FIGURA 7-23. Cadherinas y adhesión celular. Representación esquemática de dos células adheridas entre sí como resultado de interacciones entre tipos similares de cadherinas proyectadas desde la membrana plasmática de cada célula.

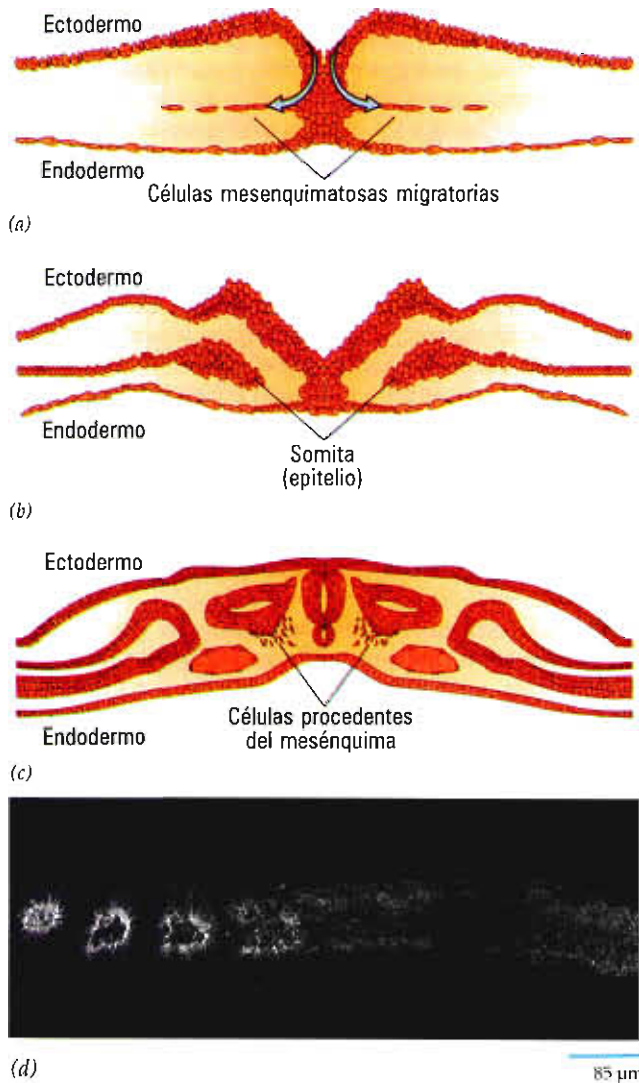


FIGURA 7-24. Cadherinas y la transformación epitelial mesenquimatosa. *a-c)* Etapas en el desarrollo temprano de un embrión de pollo. *a)* Durante la gastrulación, las células de la capa superior del embrión (epiblasto) emigran hacia un surco situado en el centro del embrión, una fosilla en el surco, y luego se desplazan lateralmente en forma de células mesenquimatosas al espacio situado por debajo del epiblasto. *b)* Algunas de estas células mesenquimatosas se reúnen en bloques de células epiteliales para formar los somitas. *c)* En la última etapa del desarrollo, una parte de la pared de cada somita se transforma en célula mesenquimatosa que emigra hacia varios tejidos periféricos. *d)* Sección sagital que pasa por un embrión de pollo a nivel de los somitas. La parte anterior del embrión se muestra a la izquierda y la parte posterior a la derecha. El eje anteroposterior de un embrión de pollo funciona como línea del tiempo para el desarrollo; ciertos sucesos ocurren primero por delante, como la formación de los distintos somitas, luego en regiones por detrás. En esta fotografía se muestra la localización de la cadherina N mediante inmunofluorescencia. La formación de un somita, que se observa progresivamente desde la porción anterior hasta la posterior de un embrión, se correlaciona con la síntesis de cadherina N. (*d)* Según Kohei Hatta, Shin Tagaki, Hajime Fujisawa y Masatoshi Takeichi, *Dev. Biol.* 120:218, 1987.)

principalmente no adhesivas) a un epitelio (capa celular organizada fuertemente adherente), o viceversa. Esta transición mesénquima-epitelio se ilustra por el movimiento de

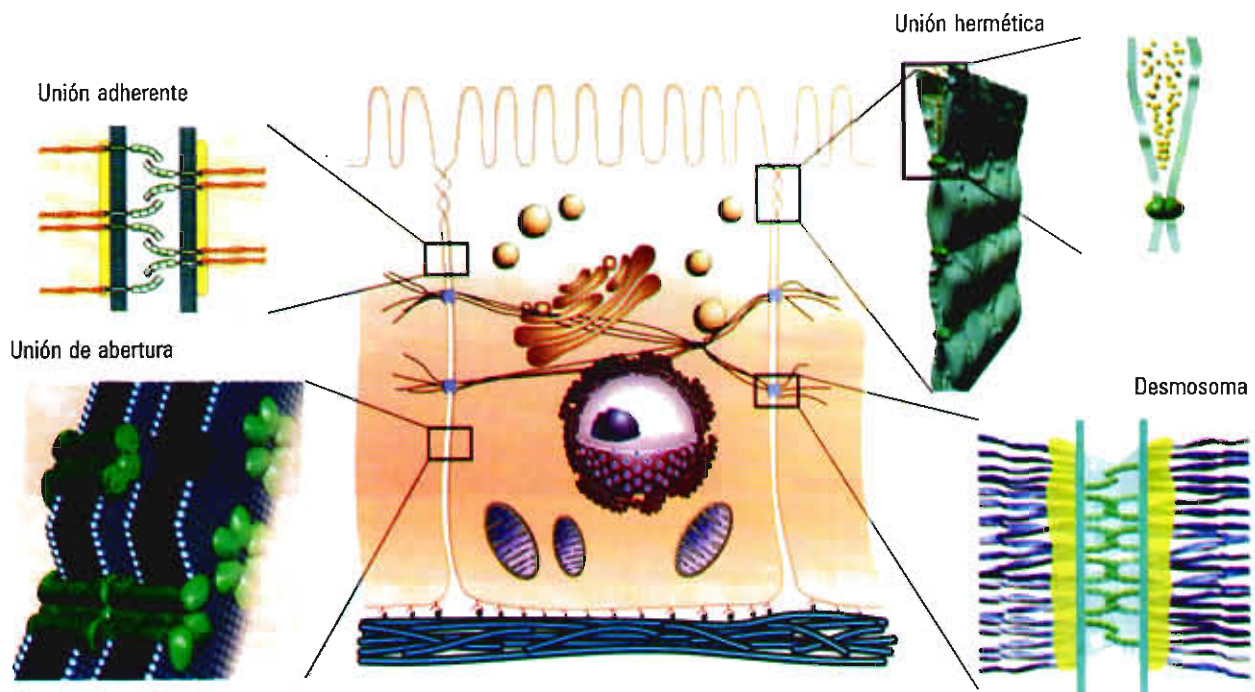
células mesodérmicas durante la etapa de gastrulación. En condiciones típicas las células se separan de una capa cohesiva en la superficie de la gástrula primitiva y vagan en regiones interiores como células mesenquimatosas (fig. 7-24, *a*). Después de algún tiempo, muchas de estas mismas células adquieren propiedades adherentes y se ensamblan en un epitelio como los somitas formados a lo largo de la línea media dorsal del embrión (fig. 7-24, *b*). A continuación, en una etapa posterior, las células de ciertas partes del somita pierden su adhesividad y comienzan una vez más a vagar como mesénquima (fig. 7-24, *c*) en las extremidades en desarrollo para formar músculo o cartilago, o abajo de la epidermis en desarrollo para formar tejidos dérmicos. La agregación de células en un epitelio, como los somitas, se correlaciona con la aparición de cadherina N sobre la superficie de las células (fig. 7-24, *d*), una propiedad que debe promover la adhesividad mutua entre las células. En contraste, la dispersión de células a partir de un epitelio se correlaciona con la desaparición de cadherina N (y la posible aparición de integrinas que median la adherencia entre una célula y su matriz extracelular).

La asociación de células en tejidos se acompaña de la formación de uniones especializadas célula-célula, donde las cadherinas desempeñan un papel importante.

Uniones adherentes y desmosomas: fijación de una célula a otras células

Las células de ciertos tejidos, particularmente epitelios y músculo cardíaco, son notoriamente difíciles de separar debido a que se mantienen firmemente unidas entre sí por uniones adherentes especializadas. Hay dos tipos principales de uniones adherentes: uniones adherentes y desmosomas. Además de estas uniones, las células epiteliales a menudo contienen otros tipos de uniones célula a célula localizadas a lo largo de su superficie lateral cerca de la luz apical (fig. 7-25). Considerada en conjunto, esta especie de superficie especializada se denomina **complejo de unión intercelular**. En los siguientes párrafos se describe la estructura y función de las dos uniones adherentes del complejo, en tanto que el análisis de los otros tipos de uniones epiteliales (uniones apretadas y uniones de abertura) se consideran más adelante en este capítulo.

Las **uniones adherentes** (o *zonula adherens*) se observan en varios sitios del cuerpo. Son particularmente comunes en epitelios como el que reviste el intestino, donde adoptan la forma de un "cinturón" que rodea a cada célula cerca de su superficie apical, enlazándola a sus vecinas. Las membranas plasmáticas de una unión adherente están separadas por un espacio de 20 a 35 nm, sitio donde se concentran moléculas de cadherina (fig. 7-26, *a*). Estas células al parecer se mantienen juntas por uniones dependientes de calcio formadas entre los dominios extracelulares de moléculas de cadherina que sirven de puente entre las brechas de células vecinas. El dominio citoplásmico de las moléculas de cadherina de las uniones adherentes se une mediante miembros de una familia de proteínas citoplásmicas, denominadas *cateninas*, con filamentos de actina del citoesqueleto (fig. 7-26, *b*). Por lo tanto, igual que las integrinas de un contacto



(a)



(b)

0.1 μm

FIGURA 7-25. Complejo de unión intercelular. a) Diagrama que muestra el complejo de unión sobre las superficies laterales cerca de la luz de una sola célula de epitelio columnar. Consta de una unión hermética (*zonula ocludens*), una unión adherente (*zonula adherens*) y un desmosoma (*macula adherens*). Otros desmosomas y las uniones de abertura se localizan más profundamente a lo largo de la superficie lateral de las células. El epitelio se apoya sobre una membrana basal. b) Micrografía electrónica de un complejo de unión entre dos células epiteliales del intestino de ratón. TJ, unión hermética; AJ, unión adherente; D, desmosomas. (b: Según Eveline E. Schneeberger, *Am. J. Physiol.* 262:L648, 1992.)

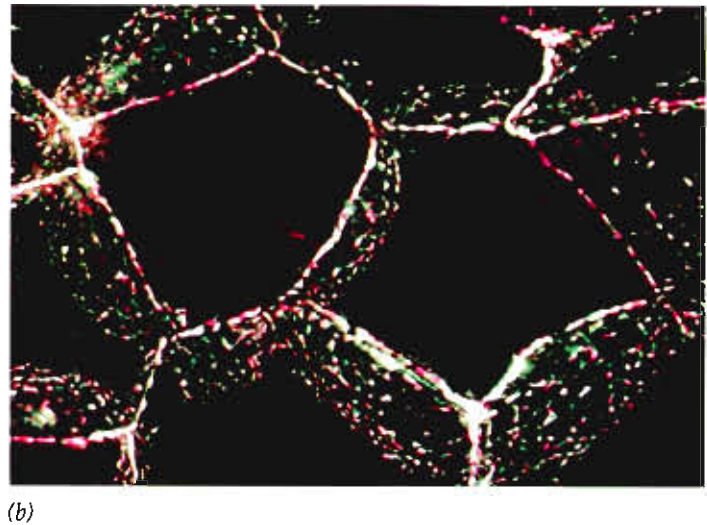
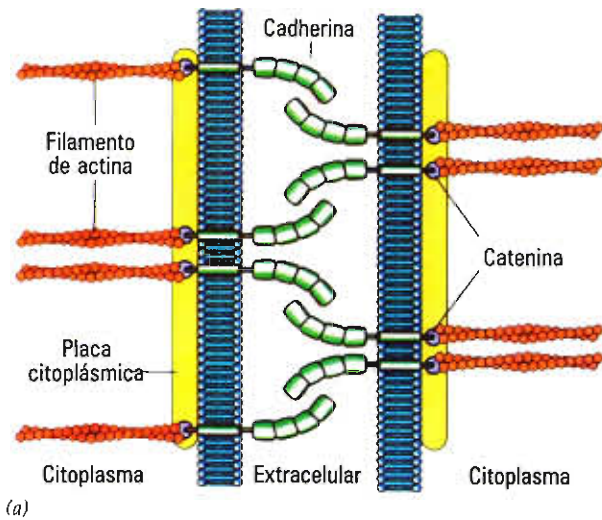


FIGURA 7-26. Estructura de la unión adherente. a) Modelo esquemático de la arquitectura molecular de una unión adherente. El dominio citoplásmico de la molécula de cadherina se conecta con los filamentos de actina del citoesqueleto mediante enlaces formados por proteínas que incluyen las cateninas. b) Micrografía que muestra células epiteliales cultivadas en contacto entre sí para formar una lámina semejante a un epitelio. Las células se fijaron y reaccionaron con anticuerpos a cadherina E (fluorescencia roja) y con anticuerpos a una de las cateninas (fluorescencia verde), que son proteínas que unen la cola citoplásmica de las cadherinas con los filamentos de actina del citoesqueleto. En las regiones donde ambos anticuerpos están teñidos las células se observan en color blanco. La imagen tridimensional se obtuvo inclinando las células de modo que pueda observarse la membrana plasmática lateral. Los extremos apicales de las células están marcados por uniones adherentes donde las concentraciones de cadherina y catenina son más altas. (a: Según S. Tsukita y cols. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:837, 1992; b: cortesía de Inke S. Nathke y Jason R. Swedlow.)

focal, las cadherinas de una unión adherente conectan el ambiente externo con el citoesqueleto intracelular.

Los **desmosomas** (o *maculae adherens*) son uniones adherentes discoides (fig. 7-27, a) observadas en varios tejidos, pero más notablemente en epitelios, donde se presentan en situación basal respecto de las uniones adherentes (fig. 7-25). Las membranas plasmáticas de un desmosoma están separadas por 20 a 35 nm. La región entre las células (*desmoglea*) está llena con un material ligeramente teñido que se cree actúa como "pegamento" de colágena viscosa. Las placas citoplásmicas densas sobre la superficie interna de la membrana plasmática sirven como sitios de fijación para filamentos intermedios en asa (no microfilamentos, como en las uniones adherentes) que se extienden al interior del citoplasma (fig. 7-27, a,b). Estos filamentos intermedios abrazan toda la amplitud de la célula interconectando la superficie interna de los desmosomas situados sobre lados opuestos de la célula. Los desmosomas son particularmente abundantes en tejidos sujetos a esfuerzo mecánico, como la piel y el cuello uterino. La red de filamentos intermedios semeja una cuerda y suministra continuidad estructural y resistencia tensil a toda la capa de células.

Las membranas plasmáticas de un desmosoma contienen varios miembros de la familia de las cadherinas (*desmogleínas* y *desmocollinas*), que se cree conectan el material extracelular situado entre membranas plasmáticas en aposición con los filamentos intermedios de las placas citoplásmicas. La importancia de las cadherinas para mantener la integridad estructural de un epitelio se ilustra por una enfermedad autoinmunitaria (*el pénfigo vulgar*), en la cual se producen anticuerpos contra una de las desmogleínas, lla-

mados *antígeno del pénfigo vulgar*. La enfermedad se caracteriza por pérdida de la adherencia de célula a célula en la epidermis y la presencia de grandes ampollas sobre la piel.

Papel de los receptores de adherencia celular en las señales transmembrana

En la figura 7-28 se presenta un resumen de muchos puntos tratados en páginas previas de este capítulo. El esquema muestra cada uno de los cuatro tipos de moléculas de adherencia celular analizados en secciones previas y sus interacciones con los materiales extracelular y citoplásmico. Uno de los papeles de las proteínas integrales de membrana es transmitir información a través de la membrana plasmática, proceso conocido como **señales transmembrana**. Aunque este tema será explorado con detalle en el capítulo 15, podemos hacer notar que los cuatro tipos de receptores de adherencia celular ilustrados en la figura 7-28 tienen potencial para efectuar esta función. Por ejemplo, integrinas y cadherinas pueden transmitir información entre el medio extracelular y el citoplasma por su capacidad para formar enlaces con el citoesqueleto. La unión de una integrina con su ligando puede inducir varias respuestas dentro de una célula, incluyendo cambios del pH citoplásmico, concentración de Ca^{2+} , fosforilación de proteínas y expresión de genes. Estos cambios, a su vez, pueden alterar el potencial de crecimiento celular, la actividad migratoria o el estado de diferenciación. La importancia de dichos receptores se puede ilustrar al desarrollar células epiteliales de glándula mamaria en ausencia de glucoproteínas extracelulares, como

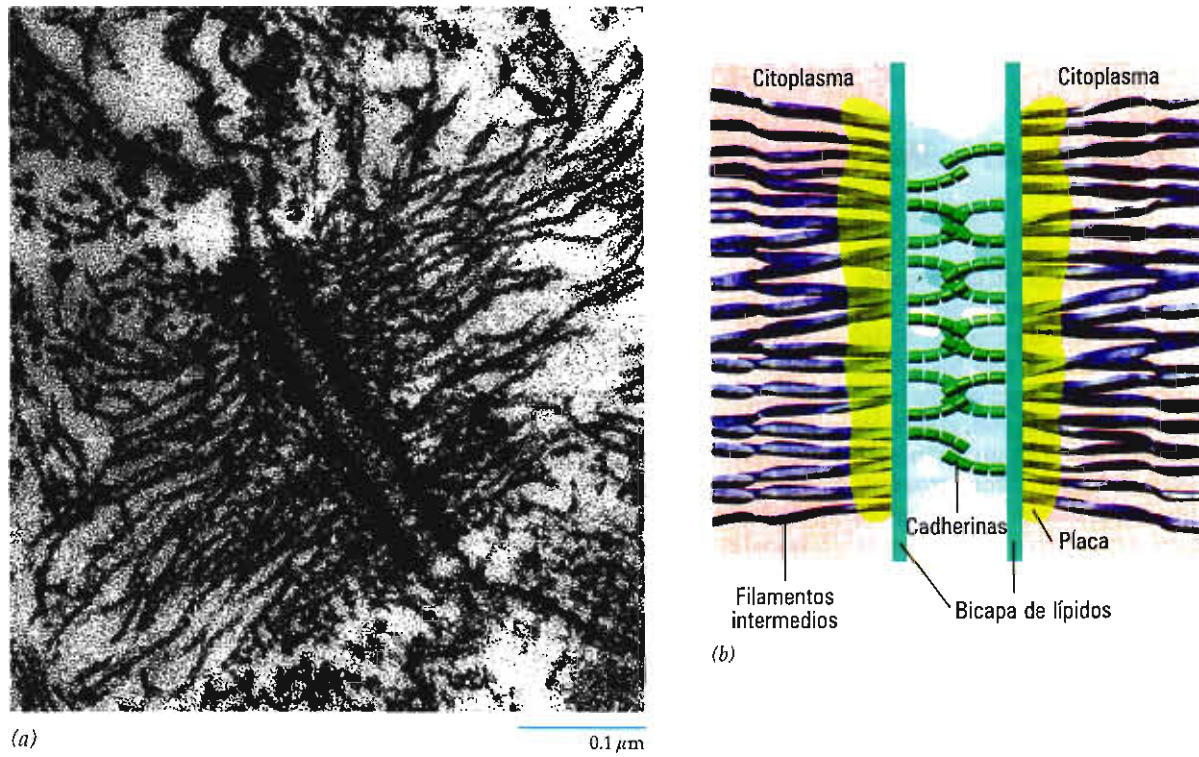


FIGURA 7-27. Estructura de un desmosoma. a) Micrografía electrónica de un desmosoma de piel de salamandra. b) Modelo esquemático de la arquitectura molecular de un desmosoma. (a: Según Douglas E. Kelly, *J. Cell Biol.* 28:51, 1966; con permiso de Rockefeller University Press.)

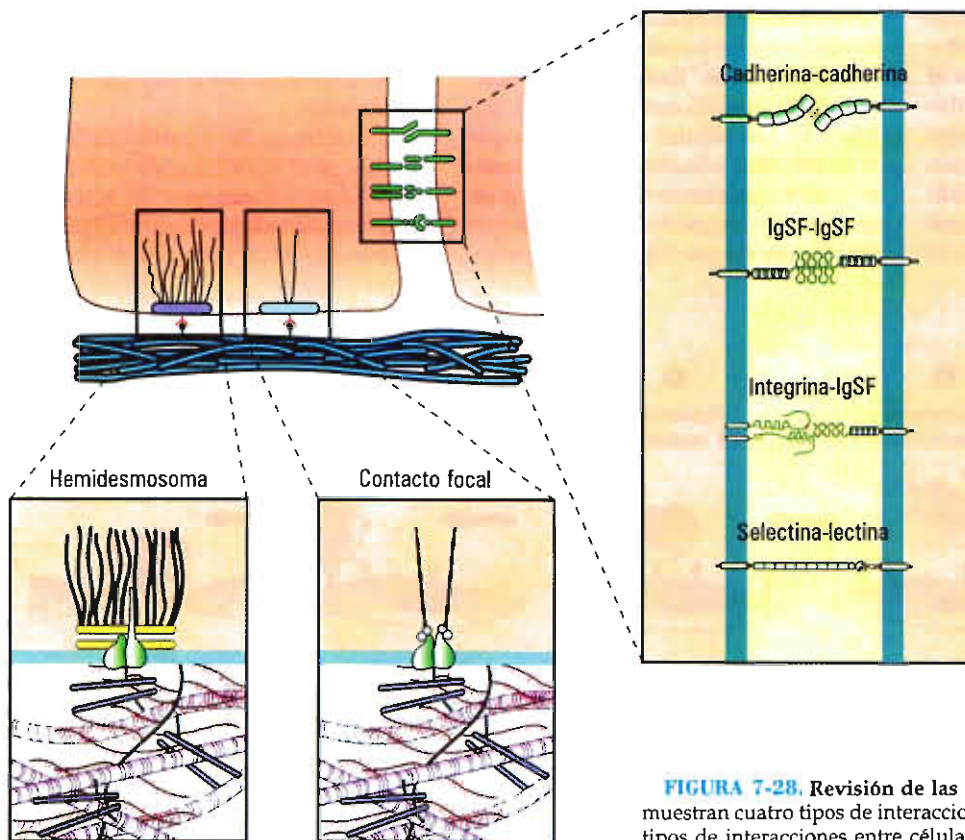


FIGURA 7-28. Revisión de las interacciones de la superficie celular. Se muestran cuatro tipos de interacciones de adherencia de célula a célula y dos tipos de interacciones entre células y sustratos extracelulares.

LA PERSPECTIVA HUMANA

Papel de la adherencia celular en la inflamación y la metástasis

La inflamación es una de las respuestas primarias de los vertebrados a la infección. Cuando alguna parte del cuerpo se contamina con bacterias, como puede ocurrir luego de una herida punzocortante en la piel, el sitio lesionado se convierte en un imán para gran variedad de leucocitos; éstos normalmente permanecen en el torrente sanguíneo, pero ahora atraviesan la capa endotelial y las membranas basales subyacentes que revisten las venas más pequeñas (vénulas) de la región y penetran al tejido. Una vez en el tejido, los leucocitos atacan a los microorganismos invasores e ingieren los desperdicios. Aunque la inflamación es una respuesta protectora, también produce efectos colaterales negativos como fiebre, hinchazón por acumulación de líquido, enrojecimiento y dolor. También puede desencadenarse una inflamación inapropiada, como ocurre cuando se interrumpe el flujo de sangre a un tejido luego de un ataque al corazón o de un accidente vascular cerebral. Cuando se restablece el riego sanguíneo al órgano, una onda destructiva recorre el tejido (proceso conocido como daño por *reperfusión*). Una respuesta inflamatoria excesiva también

puede producir asma, síndrome de choque tóxico y síndrome de sufrimiento respiratorio. Gran parte de la investigación se centra en preguntas como la siguiente: ¿cómo se reclutan leucocitos en los sitios inflamados?; ¿por qué detienen su flujo a través de la corriente sanguínea y se adhieren a la pared de los vasos?; ¿cómo penetran en las paredes de los vasos?; ¿cómo pueden suprimirse algunos efectos negativos de la inflamación sin interferir en los aspectos benéficos de la respuesta inflamatoria? Las respuestas a preguntas acerca de la inflamación se han enfocado en tres tipos de moléculas para la adherencia celular: selectinas, integrinas y moléculas IgSF.

En la figura PH 7-1 se muestra una cadena de acontecimientos propuestos para explicar lo que ocurre durante la inflamación aguda. Una de las primeras etapas de la inflamación se presenta conforme las paredes de las vénulas responden a los "llamados de ayuda" del tejido dañado cercano (paso 1, fig. PH 7-1). Las células endoteliales que revisten estas vénulas se vuelven más adhesivas para neutrófilos circulantes, un tipo de leucocito fagocitario que efectúa un ataque rápido e inespecífico

co contra patógenos invasores. Este cambio de las propiedades de adherencia es mediado por el despliegue transitorio de selectinas P sobre la superficie de células endoteliales activadas en la región dañada (paso 2, fig. PH 7-1). Cuando los neutrófilos encuentran las selectinas forman adherencias transitorias que hacen lento su movimiento. En esta etapa se puede observar que las células "ruedan" lentamente a lo largo de la pared del vaso. Algunas compañías de biotecnología están tratando de desarrollar fármacos antiinflamatorios que actúen al impedir el enlace de ligandos a selectinas. Los anticuerpos antiselectina tienen capacidad para interrumpir el "rodamiento" de los neutrófilos sobre superficies revestidas de selectina P *in vitro* y suprimir la inflamación en animales. Se debe lograr un efecto bloqueador semejante utilizando carbohidratos sintéticos que entren en competencia con ligandos carbohidrato sobre la superficie de los neutrófilos.

Conforme los neutrófilos interactúan con el endotelio de vénulas inflamadas, un proceso de activación (desencadenado por un fosfolípido denominado *factor activador de plaquetas*,

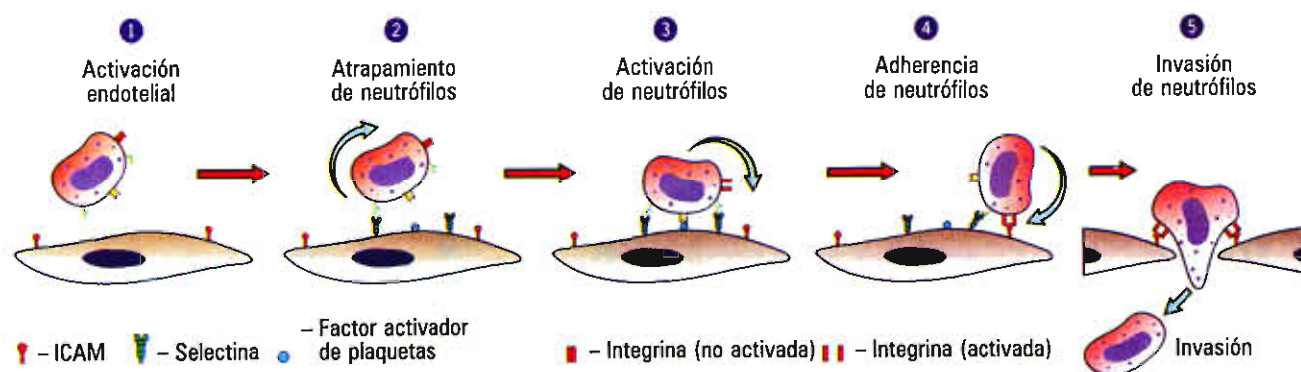


FIGURA PH 7-1 Etapas en el desplazamiento de neutrófilos desde el torrente sanguíneo durante la inflamación. Estas etapas se describen en el texto.

producido por el endotelio) incrementa el enlace de integrinas ya situadas sobre la superficie del neutrófilo (paso 3, fig. PH 7-1). Las integrinas activadas se enlazan a moléculas IgSF (ICAM)* sobre la superficie de las células endoteliales y causan que los neutrófilos detengan su rodamiento y se adhieran firmemente a la pared del vaso (paso 4, fig. PH 7-1). A continuación, los neutrófilos unidos cambian su forma y se deslizan a través de la capa endotelial (proceso denominado *extravasación*) al interior del tejido dañado (paso 5, fig. PH 7-1). Esta cascada de sucesos, que implica diferentes tipos de moléculas para adherencia de células, garantiza que la unión de células sanguíneas a la pared vascular y su penetración subsiguiente sólo ocurra en sitios donde se requiera la presencia de leucocitos.

La importancia de las integrinas en la respuesta inflamatoria se demuestra por una enfermedad rara denominada *deficiencia de adherencia leucocitaria* (DAL). Las personas con esta enfermedad no producen la subunidad β_2 , que forma parte de algunas integrinas de leucocitos. En consecuencia, los leucocitos de estas personas no pueden adherirse a la capa endotelial de las vénulas, paso requerido para salir del torrente sanguíneo. Estos pacientes sufren frecuentes infecciones bacterianas que ponen en riesgo su existencia, y que a veces son mortales. El mejor tratamiento de la enfermedad consiste en trasplante de médula ósea que suministra al paciente las cepas celulares capaces de formar leucocitos normales. La administración de anticuerpos contra la subunidad β_2 puede simular los efectos de DAL al interrumpir el movimiento de neutrófilos y de otros leucocitos hacia afuera de los vasos sanguíneos. Estos anticuerpos han mostrado utilidad en la prevención del daño por

reperusión luego de un ataque cardíaco.

En el cáncer, las células escapan de los mecanismos normales del cuerpo para controlar el crecimiento y proliferan de manera irregular. Si las células cancerosas permanecieran aisladas en una sola masa, como ocurre en condiciones típicas, por ejemplo, el cáncer de tiroides o algunos tipos de cáncer cutáneo, la mayor parte de los tumores cancerosos serían fáciles de curar mediante extirpación quirúrgica del tejido enfermo. Sin embargo, casi todos los tumores malignos desprenden células capaces de salir de la masa tumoral primaria, penetrar a la corriente sanguínea o los conductos linfáticos e iniciar el crecimiento de tumores secundarios en otras partes del cuerpo. La propagación de un tumor dentro del cuerpo se llama **metástasis** y es la razón de que el cáncer sea una enfermedad tan devastadora. Se cree que las células metastáticas (células cancerosas capaces de formar tumores secundarios) poseen propiedades especiales en la superficie celular no compartidas con la mayor parte de otras células del tumor. Las células metastáticas deben ser menos adherentes que otras células para “liberarse” de la masa tumoral; también deben poder atravesar gran número de barreras, como paredes vasculares o la membrana basal que rodea a los tejidos, y además también deben ser capaces de invadir tejidos normales para formar colonias secundarias. Igual que los estudios de inflamación descritos antes, los intentos para entender las bases moleculares de la metástasis se han enfocado en las proteínas de la superficie celular que median la adherencia celular.

En la producción de metástasis se ha implicado a cambios en el número y tipo de diferentes moléculas de adherencia celular, y por lo tanto a la capacidad de las células para adherirse a otras células o matrices extracelulares. Por ejemplo, la presencia de receptores capaces de unirse a laminina se correlaciona con la conducta metastática del cáncer mamario del ser humano y de las células de los melanomas: las células que se adhieren con mayor avi-

dez a las superficies revestidas con laminina muestran mayor potencial metastático cuando se inyectan a ratones de laboratorio. Es de esperar que la presencia de receptores a laminina ayude a las células cancerosas a penetrar membranas basales ricas en laminina. La incubación de células de melanoma con fragmentos de laminina antes de inyectarlos, tratamiento que “amarra” a los receptores de la célula para laminina, reduce notablemente el número de tumores desarrollados en los animales huésped. En contraste, las células malignas con frecuencia contienen un pequeño número de receptores para fibronectina (como la integrina $\alpha_5\beta_1$), propiedad que puede aumentar la capacidad de las células para desplazarse sobre su matriz extracelular. Cuando las células malignas se someten a manipulaciones de ingeniería genética para expresar concentraciones mucho más elevadas de integrinas $\alpha_5\beta_1$, disminuye mucho su capacidad para producir tumores en ratones.

Cambios en la concentración de cadherina pueden suministrar otra medida del potencial metastático. En una investigación de células tumorales epiteliales, cuanto mayor fue el nivel de expresión de cadherina E, menor el potencial metastático de las células. Otros estudios sugieren que la pérdida progresiva de cadherinas de la superficie de las células cancerosas conforme crecen en un tumor aumenta el nivel de malignidad de las células. Al parecer, la presencia de cadherina E favorece la adherencia de las células entre sí, en tanto que la pérdida de este receptor de la membrana favorece la dispersión de las células tumorales a sitios distantes. En realidad, cuando se obliga a las células malignas a expresar copias extra del gen cadherina E, reducen mucho su capacidad de causar tumores cuando se inyectan a animales huésped. Al juntar los resultados de estos estudios se puede concluir que las moléculas para adherencia celular desempeñan un papel importante en el avance de la enfermedad maligna. Aun no se determina si dichas moléculas pueden ser objetivos útiles en la terapéutica del cáncer.

* La presencia de moléculas ICAM se puede emplear como indicador de reacción inflamatoria en evolución. Por ejemplo, la presencia de ICAM-1 en la bilis de pacientes a quienes se ha practicado trasplante hepático demuestra rechazo del nuevo órgano.

fibronectina y laminina. Estas células muestran un aspecto aplanado, indiferenciado y producen leche con muy poca proteína. Cuando se añade laminina al cultivo esta proteína se une a las integrinas situadas en la superficie de las células, estimula una transformación de las células para diferenciarlas en células mamarias e induce un incremento 50 veces mayor en la producción de proteínas de la leche.

Inversamente, los cambios en el citoplasma pueden generar señales transferibles al exterior a través de la membrana plasmática. Las demostraciones de señales “de dentro hacia afuera” provienen de estudios efectuados con integrinas cuya conformación puede cambiar según el estado fisiológico de las células. Por ejemplo, las plaquetas de la sangre circulante normalmente no se unen a moléculas de fibrinógeno en la sangre. Sin embargo, cuando se activan en un sitio de lesión vascular, las integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ situadas en la superficie de las plaquetas sufren un cambio de conformación que aumenta su afinidad a fibrinógeno. El enlace de fibrinógeno a integrinas activadas provoca agregación de plaquetas y taponamiento de la herida (fig. 7-15). La formación de placas de colesterol en la pared de una arteria también puede activar plaquetas y conducir a la formación de un coágulo sanguíneo capaz de obstruir una arteria coronaria y provocar ataque al corazón.

7-4 Uniones herméticas: sellado del espacio extracelular

Desde hace varios decenios los biólogos saben que cuando se colocan ciertos tipos de epitelio, como piel de rana o pared de la vejiga urinaria, entre dos compartimientos que contienen diferentes concentraciones de soluto, la difusión de iones o solutos de un compartimiento al otro a través del epitelio es muy escasa. Dada la impermeabilidad de las membranas plasmáticas no es sorprendente que los solutos no puedan difundir libremente a través de las células de una capa epitelial, pero ¿por qué estas sustancias no pueden atravesar los espacios situados entre las células? La razón se demostró en la época de 1960 a 1970, cuando se describieron contactos especializados denominados **uniones herméticas**, formadas entre células epiteliales vecinas.

Estas uniones ocurren en el extremo más alejado del borde apical de los complejos de unión entre células epiteliales adyacentes (fig. 7-25). La figura 7-29, *a*, es una micrografía electrónica de una sección efectuada a través de una unión hermética perpendicular a las membranas de células adyacentes. Se observa que las membranas adyacentes hacen contacto en puntos discontinuos en vez de fusionarse en una superficie amplia. Como se indica en el modelo de la figura 7-29, *b*, se cree que los puntos de contacto celular representan sitios donde las proteínas integrales de dos membranas adyacentes se encuentran en el espacio extracelular. Recientemente se purificó la proteína integral de las uniones herméticas y se le denominó *occludina*.

El análisis de fracturas por congelación, que permite observar la cara interna de la membrana, muestra que las membranas plasmáticas de la unión hermética contienen fibras interconectadas (fig. 7-29, *c*) que corren paralelas entre sí y con la superficie apical del epitelio. Las fibras (o

surcos en la cara opuesta de la membrana fracturada) corresponden a hileras de proteínas integrales de membrana alineadas que pueden observarse en sección transversal en las figuras 7-29, *a* y *b*. Las hileras de proteínas de membrana forman una banda continua que rodea por completo la célula como un empaque, haciendo contacto por todos lados con las células vecinas (fig. 7-29, *d*). En consecuencia, las uniones herméticas son uniones ocluyentes; o sea, forman una barrera continua de impermeabilidad que sella el espacio extracelular sobre uno de los lados del epitelio en relación con el otro lado. Las uniones herméticas con gran número de fibras tienden a establecer un mejor sellado en comparación con las uniones de fibras escasas.

La capacidad de las uniones herméticas para impedir el paso de moléculas entre las células se puede demostrar sumergiendo un pedazo de tejido en un material electrónicamente denso, como el metal pesado lantano. Cuando se examina posteriormente el tejido en el microscopio electrónico, se observa que el lantano penetra entre las células pero sólo hasta los bordes superior e inferior de las uniones herméticas (fig. 7-30).

Las uniones herméticas que unen las células endoteliales de los capilares cerebrales forman la *barrera hematoencefálica*, que impide el paso de sustancias de la corriente sanguínea al interior del tejido cerebral. La barrera hematoencefálica protege al cerebro de la penetración de solutos “indeseados”, pero también evita el acceso de muchos fármacos al sistema nervioso central. Por consiguiente, uno de los objetivos de la industria farmacéutica es desarrollar técnicas para “abrir” las uniones herméticas del cerebro y permitir el paso de agentes terapéuticos de peso molecular elevado.

Es digno de mencionar que algunos iones pequeños e incluso moléculas de agua no pueden penetrar ciertas uniones herméticas, pero en cambio las células del sistema inmunológico capaces de penetrar a los tejidos inflamados (página 260) pueden atravesar capas epiteliales a través de estas uniones. Se cree que estas células envían una señal que abre la unión, permitiéndoles el paso. Puesto que durante el paso de los leucocitos no disminuye la resistencia eléctrica de la capa epitelial, se cree que las uniones herméticas deben abrirse alrededor de los leucocitos y mantener estrecho contacto con las células inmunológicas que las atraviesan.

7-5 Uniones de abertura y plasmodesmosomas: mediación de la comunicación celular

Las **uniones de abertura** son sitios entre células animales especializadas para la comunicación intercelular. Las micrografías electrónicas revelan que estas uniones de abertura son sitios donde las membranas plasmáticas de células adyacentes se ponen en estrecho contacto entre sí (a una distancia aproximada de 3 nm), pero no entran en contacto directo. En vez de ello, la abertura entre las células es atravesada por “fibras” sumamente finas (fig. 7-31, *a*) que en realidad son “cañerías” moleculares que pasan a través de membranas plasmáticas adyacentes y se abren en el cito-

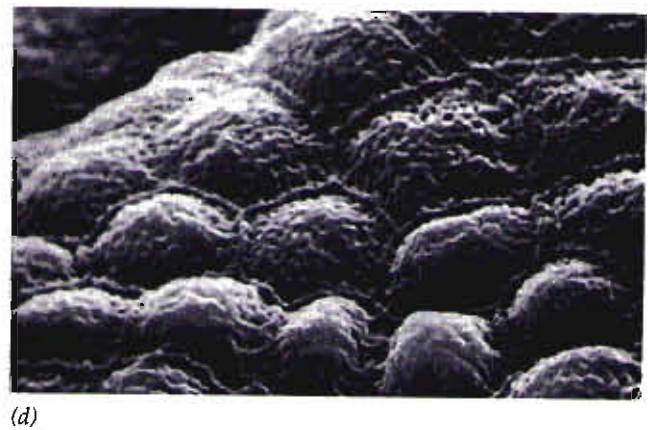
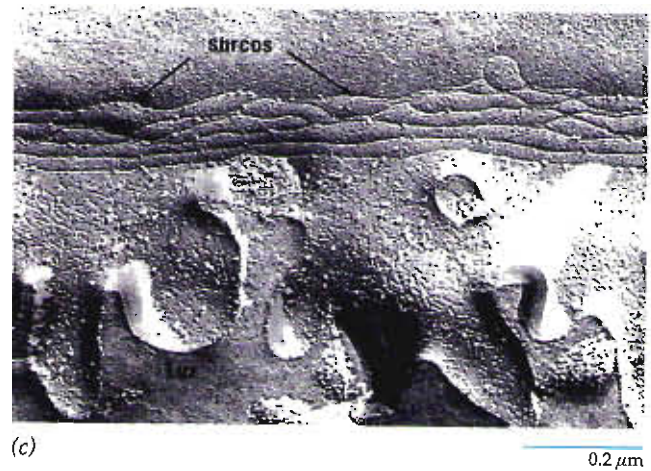
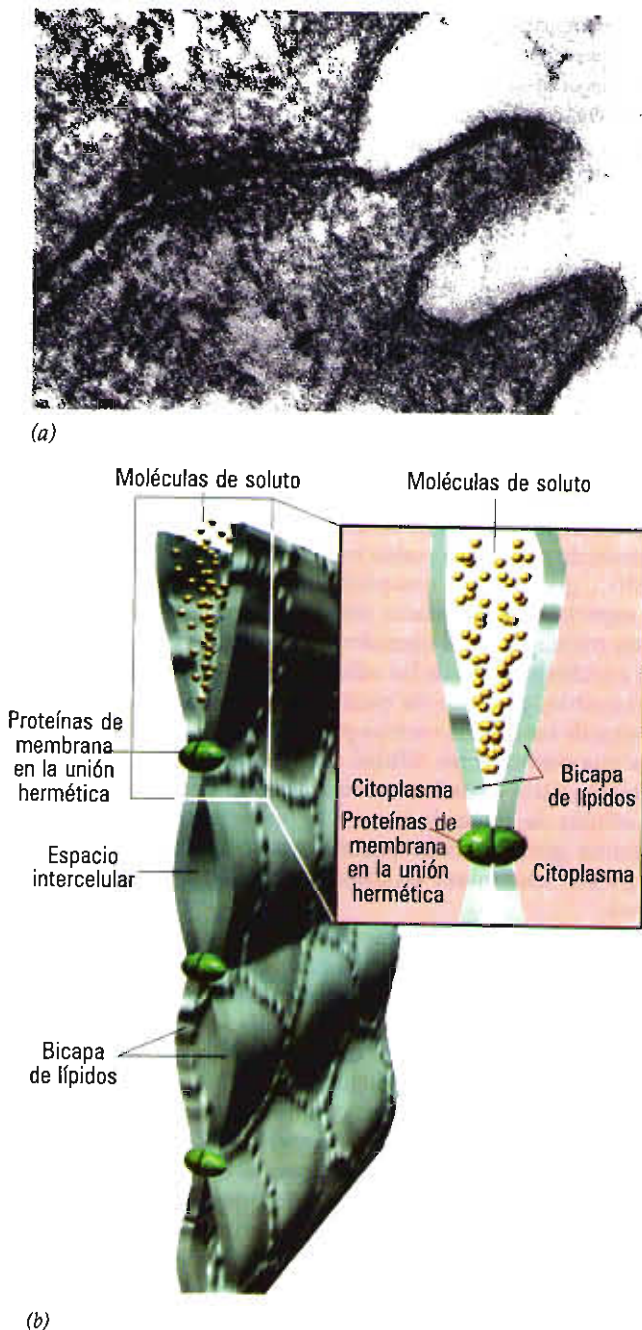


FIGURA 7-29. Uniones herméticas. *a)* Micrografía electrónica de un corte a través de la región apical de dos células epiteliales adyacentes que muestra en qué sitio las membranas plasmáticas de las dos células se reúnen en puntos intermitentes en la unión hermética. *b)* Modelo de unión hermética que muestra los puntos intermitentes de contacto entre proteínas integrales de dos membranas en aposición. Cada uno de estos sitios de contacto se extiende en forma de una hilera de proteínas dentro de las membranas formando una barrera que bloquea la penetración de solutos en el espacio entre las células. *c)* Réplica de una fractura por congelación que muestra la cara E de la membrana plasmática de una de las células de una unión hermética. Los surcos en la cara E permanecen luego de tirar de las proteínas integrales de membrana desde la mitad de la misma. Cada surco representa una línea continua de contacto entre las células (que aparecería como punto de contacto si la unión se hubiera cortado en sección transversal, como en la parte *a*). *d)* Gammagrafía electrónica de la superficie apical de un epitelio que muestra la naturaleza circular de las uniones herméticas. (*a*: Cortesía de Daniel S. Friend; *c*: según Philippa Claude y Daniel A. Goodenough, *J. Cell Biol.* 58:390, 1973; con permiso de Rockefeller University Press; *d*: cortesía de D. Tarin.)

plasma de células vecinas (fig. 7-31, *b*). Las uniones de abertura unen células de casi todos los tejidos de mamíferos; las principales excepciones son el músculo esquelético y la mayor parte del tejido nervioso.

En comparación con otras uniones intercelulares, las uniones de abertura muestran una composición molecular simple; consisten casi en su totalidad de una proteína integral de membrana denominada *conexina*. Las conexinas se agrupan dentro de la membrana plasmática para formar un

complejo de múltiples subunidades denominado **conexón**, que rodea completamente la membrana (fig. 7-31, *b*). Cada conexón se compone de seis subunidades de *conexina* dispuestas alrededor de un agujero o *anillo* central de aproximadamente 1.5 nm de diámetro (fig. 7-31, *c*). Los conexones son ensamblados en algún punto después que se sintetizan los polipéptidos *conexina* en el retículo endoplásmico rugoso, pero antes de llegar a la membrana plasmática (cap. 8). Las conexinas son miembros de una familia multigénica;



FIGURA 7-30. Las propiedades ocluyentes de una unión hermética se revelan experimentalmente sumergiendo el tejido en una suspensión coloidal de un metal electrónicamente denso, el lantano, antes de fijación. Se observa que el lantano penetra entre las células de este tejido epitelial de rata, pero no atraviesa la región de la unión hermética. (Cortesía de Eveline E. Schneeberger.)

cuando menos se ha aislado una docena de conexinas diferentes procedentes de distintos tejidos y también se han clonado sus genes. Algunas células sintetizan más de un tipo de conexina, pero todavía no se ha demostrado de manera concluyente si un solo conexón puede contener más de un tipo de subunidad de conexina.

Durante la formación de las uniones de abertura, los conexones de membranas plasmáticas de células opuestas se unen entre sí a través de interacciones de los dominios extracelulares de las subunidades de proteína. Una vez alineados, los conexones de células adyacentes forman canales completos que conectan el citoplasma de una célula con el citoplasma de su vecina. A veces los conexones se agrupan en regiones específicas formando placas de uniones de abertura que se visualizan mejor en las réplicas de fracturas por congelación (fig. 7-31, *d*).

Según se analiza en *La vía experimental* de este capítulo, las uniones de abertura son sitios de comunicación entre el citoplasma de células adyacentes. La existencia de comunicación intercelular por uniones de abertura (CIUA) se manifiesta por el paso de corrientes iónicas o de colorantes de bajo peso molecular, como fluoresceína, desde una célula a sus vecinas (fig. 7-32). Las uniones de abertura de mamíferos permiten la libre difusión de moléculas con peso molecular aproximado a 1 000 daltons o menos. En contraste con los canales iónicos altamente selectivos que conectan una célula con el medio externo (pág. 145), los canales de las uniones de abertura son notablemente no selectivos: si la molécula es lo bastante pequeña, pasa a través de la cañería.

Las uniones de abertura desempeñan un papel importante en el paso de corrientes iónicas de una célula a sus vecinas, como se ilustra por ondas de excitación que viajan a través de los músculos cardíaco y liso. La contracción del corazón de mamífero puede ser estimulada por un impulso eléctrico generado en una pequeña región de tejido muscular especializado llamado *nódulo sinoauricular*, que actúa como marcapaso del corazón. Los impulsos se propagan con rapidez a través de las células que constituyen la pared del corazón, pasando de cada célula muscular cardíaca al interior de las células vecinas por medio de uniones de abertura que conectan las células. De igual manera, el flujo de corriente a través de las uniones de abertura que conectan las células de músculo liso en la pared del esófago o del intestino genera ondas peristálticas coordinadas que se desplazan lentamente en dirección caudal a lo largo de la pared.

El hecho de que las uniones de abertura puedan reunir gran número de células en íntimo contacto citoplásmico constituye en realidad un compartimiento gigantesco relacionado con moléculas de tamaño suficientemente pequeño para pasar a través de los canales de comunicación. Sería de esperar que esta condición tuviese consecuencias fisiológicas muy importantes, ya que algunas moléculas reguladoras sumamente activas, como el AMP cíclico y otros segundos mensajeros (cap. 15), son lo bastante pequeñas para atravesar los canales de las uniones de abertura. Por consiguiente, se puede concluir que las uniones de abertura integran las actividades de células individuales de los tejidos en una unidad funcional capaz de responder de manera simultánea, aunque sólo una parte de las células se expongan al estímulo directo. Las uniones de abertura también permiten la cooperación metabólica entre las células porque comparten metabolitos clave, como ATP, azúcares fosfato, aminoácidos y muchas coenzimas lo bastante pequeñas para atravesar los conductos intercelulares.

Plasmodesmosomas

Las plantas carecen de uniones especializadas, como las observadas en tejidos animales, pero la mayor parte de las células vegetales se conectan entre sí por medio de plasmodesmosomas (fig. 7-33). Los **plasmodesmosomas** son conductos citoplásmicos cilíndricos, de 30 a 60 nm de diámetro, extendidos directamente entre células adyacentes a través

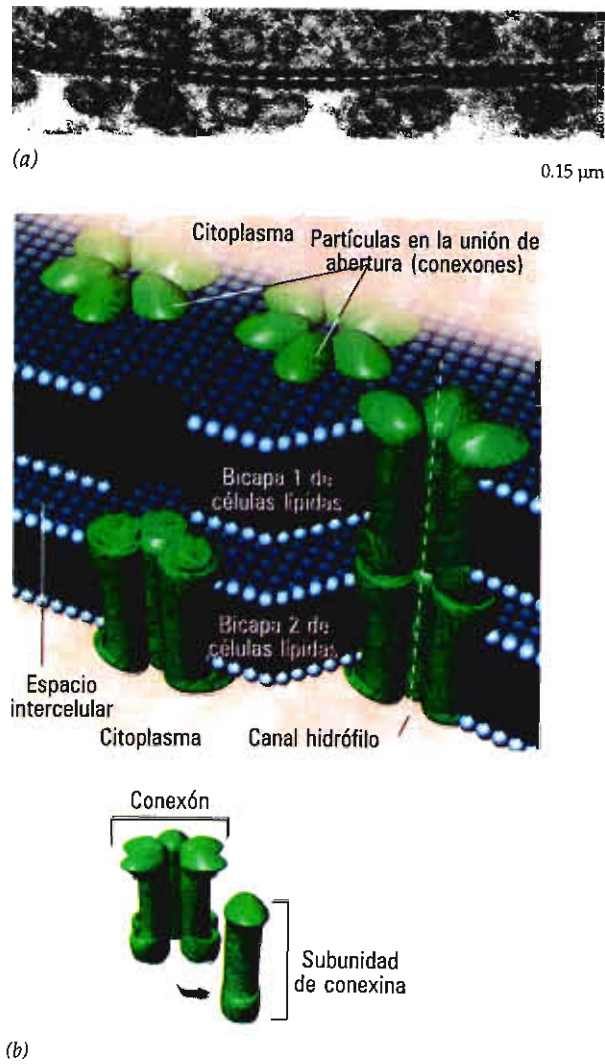
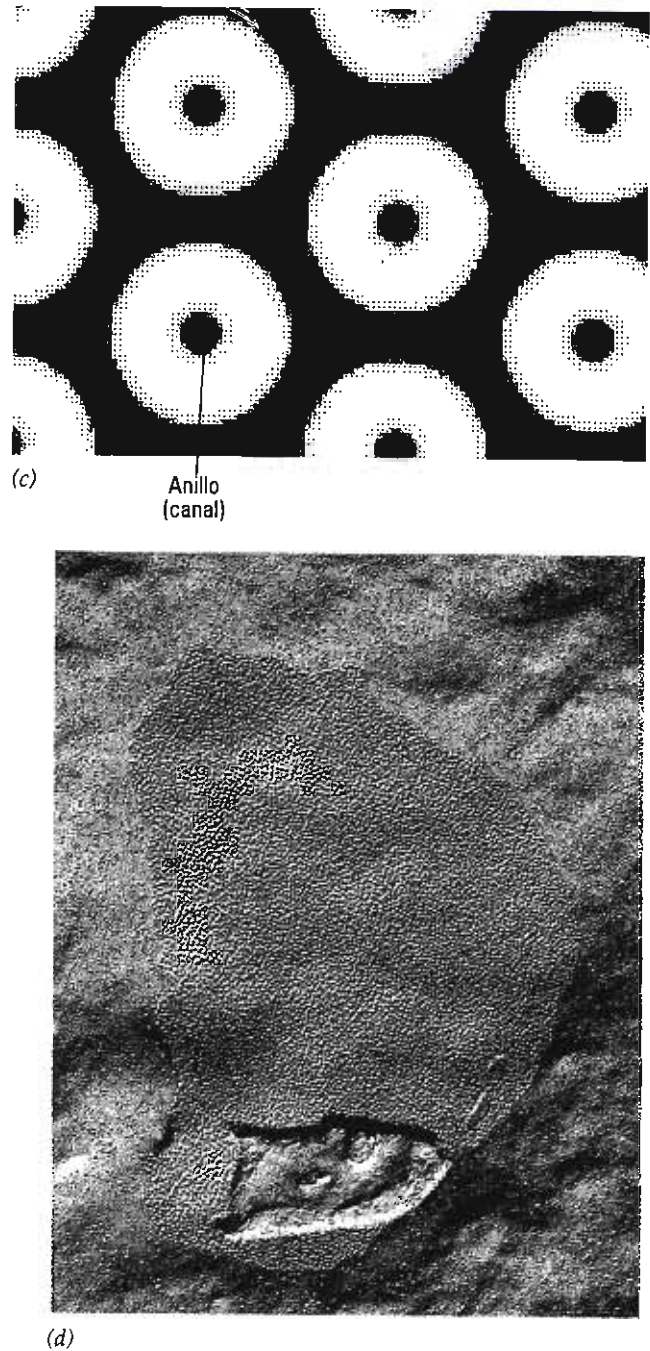


FIGURA 7-31. Estructura de la unión de abertura. *a)* Micrografía electrónica de un corte a través de una unión de abertura perpendicular al plano de las dos membranas adyacentes. El aspecto en cuentas de rosario de las membranas se debe a hileras de partículas intramembrana que sobresalen de la superficie de ambas membranas y hacen contacto en el espacio extracelular interpuesto. *b)* Modelo esquemático de una unión de abertura que muestra la disposición de seis subunidades de conexina para formar un conexón, el cual contiene el conducto central que conecta el citoplasma de las dos células adyacentes. *c)* Imagen de alta resolución basada en difracción óptica de una membrana aislada teñida en negativo que contiene una placa de uniones de abertura (como se muestra en *d)*). Se muestran las dimensiones relativas del anillo y del conexón y el empaquetamiento hexagonal de las unidades dentro de la placa. *d)* Réplica de fractura por congelación de una placa de unión de abertura mostrando el gran



número de conexones y su alto grado de concentración. (*a:* Según Camillo Peracchia y Angela F. Dullhunty, *J. Cell Biol.* 70:419, 1976; con permiso de Rockefeller University Press; *c:* cortesía de Daniel Goodenough; *d:* cortesía de David Albertini.)

de la pared celular interpuesta. Los plasmodesmosomas están revestidos de una membrana plasmática y de ordinario contienen una varilla central densa, el *desmotúbulo*, derivado del retículo endoplásmico liso de las dos células en contacto. Igual que las uniones de abertura entre células

animales, los plasmodesmosomas sirven como sitios de comunicación intercelular que unen a las células de un tejido vegetal para formar una unidad metabólica.

La vía de paso entre células vegetales adyacentes presumiblemente se limita al estrecho espacio entre la superfi-

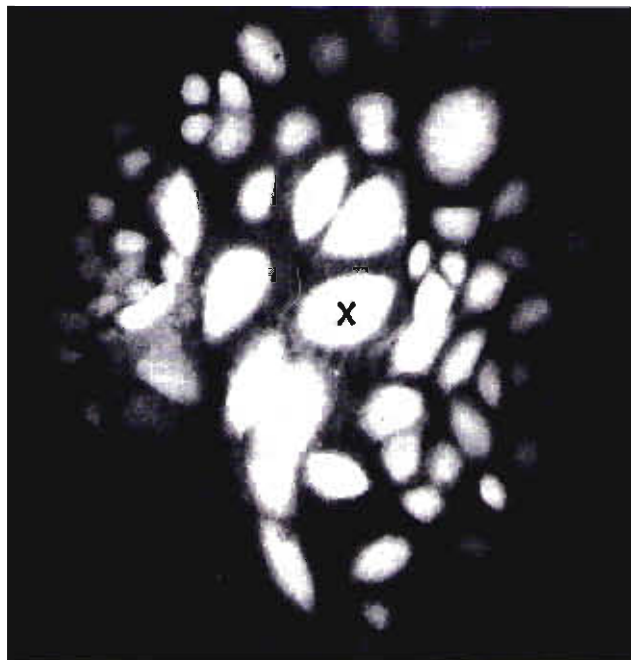


FIGURA 7-32. Resultados de un experimento que demuestra el paso de solutos de bajo peso molecular a través de las uniones de abertura. Micrografía en campo oscuro que muestra el paso de fluoresceína desde una célula en la cual fue inyectada (X) a las células que la rodean. (Según R. Azarnia y W.R. Loewenstein, *J. Memb. Biol.* 6:378, 1971.)

cie externa del desmotúbulo y la superficie interna de la membrana plasmática. Estudios acerca del movimiento de colorantes inyectados desde una célula al interior de sus vecinas sugiere que, igual que las uniones de abertura, los plasmodesmosomas normalmente son impermeables a moléculas mayores de unos 1 000 daltons. Sin embargo, infecciones por virus, como el virus del mosaico del tabaco, incrementan la permeabilidad de los plasmodesmosomas. Como resultado, las partículas virales intactas o sus ácidos nucleicos pueden pasar entre las células, propagando la infección a través de la planta.

7-6 Paredes celulares

Como es de esperar, una membrana plasmática de lípidos y proteínas de unos 10 nm de espesor sólo ofrece protección mínima al contenido celular. Por lo tanto, no es sorprendente que las células sean estructuras sumamente frágiles. Las células de casi todos los organismos diferentes de los animales están envueltas en una capa externa protectora: los protozoarios tienen una cubierta externa engrosada, en tanto que bacterias, hongos y plantas tienen paredes celulares distinguibles. Restringiremos nuestro análisis a la pared celular de las plantas.

La pared de las células vegetales desempeña numerosas funciones vitales. Confiere a las células su forma característica (fig. 7-34, a); suministra apoyo mecánico a las células y, consideradas en conjunto, a toda la planta; protege a

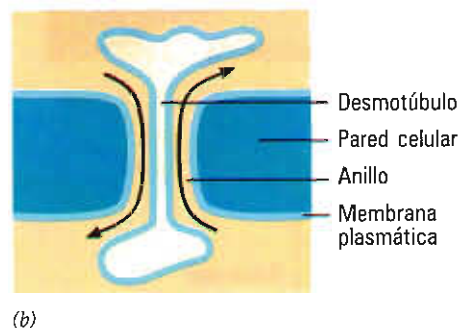
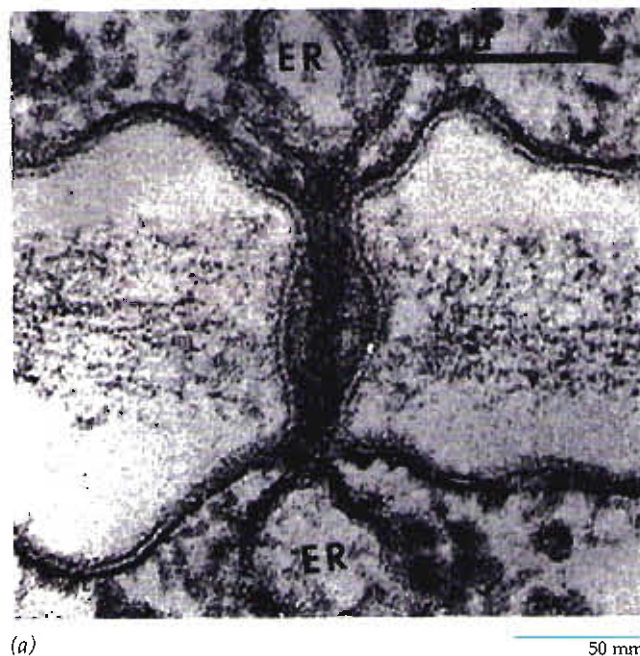
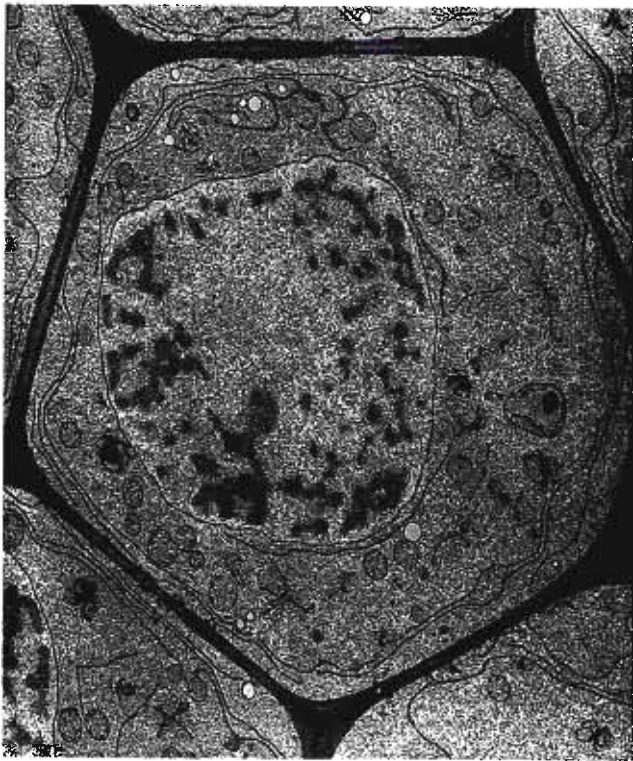
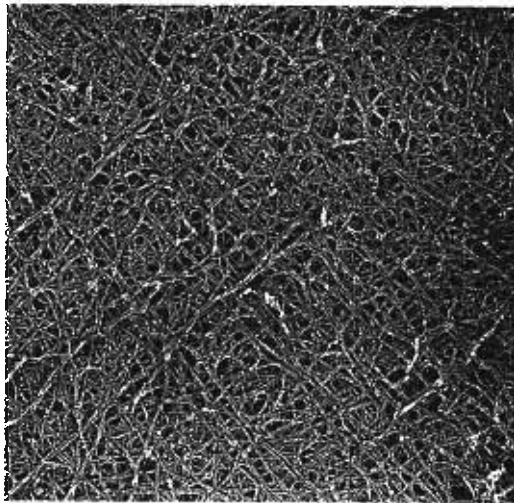


FIGURA 7-33. Plasmodesmosomas. a) Micrografía electrónica de un corte a través de un plasmodesmosoma del gametofito de un musgo. Se observa el desmotúbulo, que consiste en una membrana continua con el RE del citoplasma en ambos lados de la membrana plasmática. b) Dibujo esquemático de un plasmodesmosoma. (a: Según Lewis G. Tilney, Todd J. Cooke, Patricia S. Connelly y Mary S. Tilney, *J. Cell Biol.* 112:740, 1991; con permiso de Rockefeller University Press.)

las células contra desgaste mecánico, ingreso osmótico de agua y de patógenos; media las interacciones de célula a célula; y actúa como barrera primaria a la penetración de sustancias moleculares de gran tamaño, aunque permite con rapidez el paso de moléculas pequeñas y de iones. Cuando se quita la pared celular de una célula vegetal cultivada tratándola con enzimas desdobladoras de la pared, como la celulasa, se libera la propia célula viviente denominada *protoplasto*. Como es de esperar, los protoplastos son sumamente sensibles a cambios en su ambiente externo. En condiciones normales, las células vegetales están rodeadas de líquidos hipotónicos, lo que aumenta su volumen hasta presionar contra la pared celular y ejercer presión por turgencia (pág. 144). En contraste, si se colocan protoplastos en medios ligeramente hipotónicos, se hinchan y se rompen.



(a)



(b)

100 nm

FIGURA 7-34. Pared de una célula vegetal. a) Micrografía electrónica de una célula vegetal rodeada por su pared celular. b) Micrografía electrónica que muestra los enlaces transversales de microfibrillas de celulosa y de hemicelulosa en la pared celular de una cebolla luego de extraer los polímeros no fibrosos de la pectina. (a: Cortesía de W. Gordon Whaley; b: según M.C. McCann, B. Wells y K. Roberts, J. Cell Sci. 96:329, 1990, con permiso de The Company of Biologists Ltd.)

Las paredes de las células vegetales a menudo se comparan con materiales de construcción, como concreto reforzado con fibra de vidrio, porque contienen un elemento fibroso integrado en una matriz no fibrosa semejante a un gel. La celulosa, cuya estructura se describió en la página

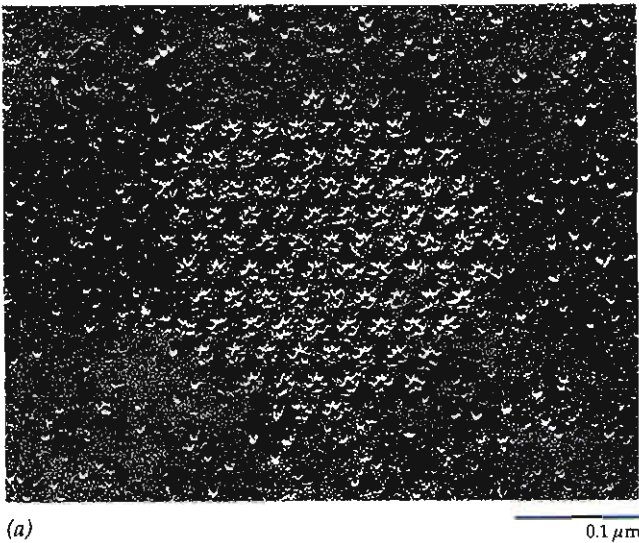
45, proporciona el elemento fibroso de la pared celular. Las moléculas de celulosa se organizan en **microfibrillas** (fig. 7-34, b), que confieren rigidez a la pared celular y suministran resistencia contra fuerzas ténsiles (tirón). Cada microfibrilla mide unos 10 nm de diámetro y se compone de un haz de 40 a 60 moléculas de celulosa orientadas paralelamente y unidas entre sí por puentes de hidrógeno. La pared celular está compuesta de capas donde las microfibrillas de capas adyacentes casi siempre se orientan en forma perpendicular entre sí (fig. 7-34, b), no muy diferente a la organización de fibras de colágena en las capas del estroma corneal (fig. 7-4).

Las moléculas de celulosa se ensamblan en la superficie celular. Un complejo enzimático integrado a la membrana plasmática añade unidades de glucosa en el extremo de una molécula de celulosa en crecimiento (fig. 7-35, a,b). La orientación de las microfibrillas en la superficie externa de la membrana plasmática al parecer es determinada por la orientación de los microtúbulos corticales situados justo por debajo de la membrana plasmática (fig. 7-35, b). En contraste con las microfibrillas de celulosa, los materiales de la matriz se sintetizan dentro del citoplasma (fig. 7-35, c) y se transportan a la superficie celular en vesículas secretorias.

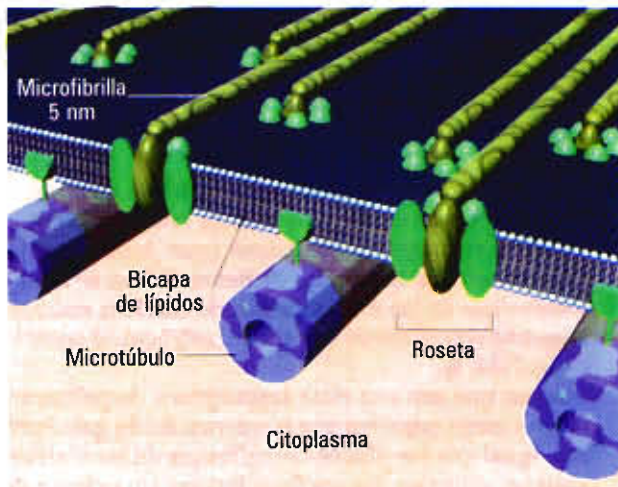
La matriz de la pared celular se compone de tres tipos de macromoléculas:

1. Hemicelulosa, un polímero de la celulosa cuyos residuos de glucosa contienen cadenas laterales de otros azúcares, principalmente xilosa (que constituye un xiloglucano). Las moléculas de hemicelulosa se unen a la superficie de las microfibrillas de celulosa enlazándolas transversalmente en una red estructural compleja (fig. 7-34, b).
2. Pectinas, que son una clase heterogénea de polisacáridos con carga negativa que contienen ácido galacturónico. Igual que los glucosaminglicanos de las matrices celulares animales, las pectinas forman un extenso gel hidratado que llena los espacios situados entre elementos fibrosos. Además, el gel que contiene pectina actúa como una criba molecular que determina el tamaño de las moléculas que pueden penetrar a la pared y llegar a la membrana plasmática. Cuando algún patógeno ataca a una planta, los fragmentos de pectina liberados de la pared actúan para estimular una respuesta defensiva de la célula vegetal. Las pectinas también constituyen la masa de la *laminilla media*, una capa que reside entre paredes celulares adyacentes y que sirve como cemento de unión. La pectina purificada se emplea comercialmente para dar consistencia de gel a compotas y gelatinas.
3. Proteínas estructurales, que desempeñan un papel importante para determinar la arquitectura de la pared celular. Entre éstas se incluyen proteínas ricas en hidroxiprolina, proteínas ricas en prolina y proteínas ricas en glicina.

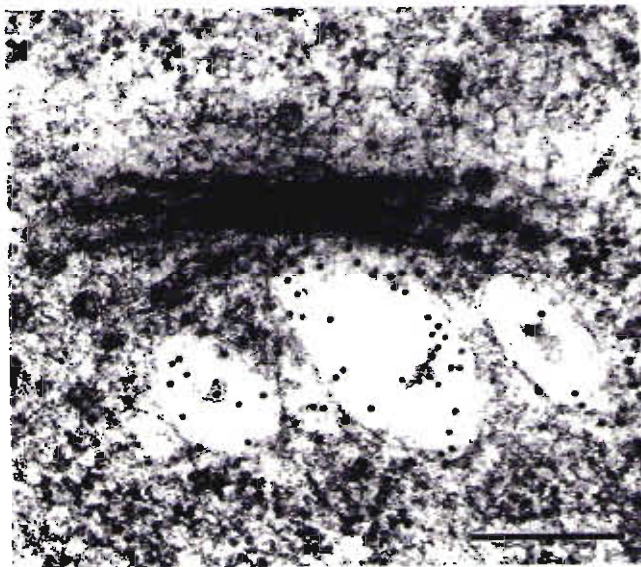
El porcentaje de estos diferentes materiales en las paredes celulares es muy variable, y depende del tipo de planta, tipo de célula y etapa de la pared. Igual que las matrices extracelulares del tejido conectivo animal, las paredes de



(a)

0.1 μm 

(b)



(c)

las células vegetales son estructuras dinámicas que pueden modificarse en respuesta a cambios de las condiciones ambientales.

Las paredes celulares se originan en una **placa celular** (descrita en la figura 14-33) situada entre el citoplasma de las células hijas recién formadas. Una vez generada la placa celular se secretan materiales en el espacio extracelular, donde se adsorben a las dos superficies de la placa para formar la pared celular, más compleja, de las células adyacentes. Además de suministrar apoyo mecánico y protección contra agentes extraños, la pared celular de una célula vegetal joven no diferenciada debe tener capacidad para crecer en igual proporción con la célula a la cual rodea. Las paredes de células en crecimiento se denominan **paredes primarias**, y permiten una distensibilidad de la cual carecen las **paredes secundarias** más gruesas presentes alrededor de la mayor parte de células vegetales maduras. El crecimiento de las paredes primarias ocurre por introducción de materiales en la estructura de una pared ya existente. Las paredes secundarias tienen mayor contenido de celulosa y, en muchos casos, más cantidad de lignina (polímero que contiene fenol y es el principal componente de la madera), prácticamente ausente en las paredes primarias. Por ejemplo, las paredes de células xileno contienen gran cantidad de lignina que suministra el apoyo estructural necesario para la translocación de agua. La superficie externa de las paredes de células epidérmicas de las hojas contiene una sustancia cética que evita la pérdida de agua y protege contra bacterias y hongos.

FIGURA 7-35. Síntesis de los materiales de la pared de una célula vegetal. a) Réplica de fractura por congelación de la membrana de la célula de una alga mostrando la cara P con un grupo de rosetas organizadas en disposición hexagonal. Se cree que estas rosetas representan las enzimas sintetizadoras de celulosa situadas dentro de la membrana plasmática. b) Modelo de la acumulación de fibrillas de celulosa. Se piensa que cada roseta forma una sola microfibrilla que se relaciona lateralmente con las microfibrillas de otras rosetas para formar una fibra cada vez mayor. Toda la disposición de rosetas puede desplazarse lateralmente en la membrana conforme va siendo empujada por las moléculas de celulosa que se alargan. Los estudios sugieren que la dirección del movimiento de las rosetas de la membrana es determinada por la orientación de los microtúbulos presentes en el citoplasma cortical por debajo de la membrana plasmática (analizado en el capítulo 9). c) Micrografía electrónica del complejo de Golgi de una célula de la cubierta de una raíz periférica con anticuerpos contra polímeros del ácido galacturónico, uno de los principales componentes de la pectina. Este material, igual que las otras pectinas y la hemicelulosa, se ensambla en el complejo de Golgi. La barra representa 0.25 μm . (a: Según T.H. Giddings, Jr., D.L. Brower y L.A. Staehelin, *J. Cell Biol.* 84:332, 1980; c: según Margaret Lynch y L.A. Staehelin, *J. Cell Biol.* 118:477, 1991; todas con permiso de Rockefeller University Press.)

LA VIA EXPERIMENTAL

Papel de las uniones de abertura en la comunicación intercelular

Según la información presentada en el capítulo precedente, se podría asumir que la transmisión sináptica siempre ocurre por liberación a partir de la neurona presináptica de un transmisor químico que se une a la superficie de la célula postsináptica. Este fue el punto de vista prevaleciente hasta el decenio de 1950, cuando Edwin Furshpan y David Potter, del University College, en Londres, encontraron una notable excepción. Furshpan y Potter estaban estudiando la transmisión sináptica entre neuronas gigantes en la cuerda nerviosa del langostino. Observaron que una pequeña despolarización *subumbral inducida en la célula nerviosa presináptica* causaba despolarización muy rápida (0.1 mseg) en la célula postsináptica.^{1,2} Si las células nerviosas se conectaban por sinapsis química, en el potencial de membrana no debía propagarse un cambio subumbral a la célula postsináptica, puesto que no es suficiente para estimular la liberación de moléculas de neurotransmisor. Aun si se liberaran moléculas de neurotransmisor, posiblemente no inducirían cambios tan rápidos en la célula postsináptica. Furshpan y Potter concluyeron que las dos células nerviosas estaban conectadas por una sinapsis de tipo diferente, una *sinapsis electrotónica*, en la cual las corrientes eléctricas procedentes de la célula presináptica podían fluir directo a la célula postsináptica en el otro lado de la sinapsis. Se asumió que ese tipo de conexión de célula a célula, que permite el flujo de corriente entre células, era peculiar de células excitables como las neuronas y se especializaba en la comunicación intercelular.

A principio del decenio de 1960, Yoshinobu Kanno y Werner Loewenstein, de la Columbia University, estudiaban las propiedades de permeabilidad de la envoltura nuclear, el complejo membranoso que rodea al núcleo. Para determinar si los iones podían atravesar la envoltura nuclear analizaron las grandes células que constituyen los tejidos epiteliales de

las larvas de la mosca de la fruta (células que suministran los cromosomas gigantes tan útiles para estudios genéticos). Estas células eran lo bastante grandes para permitir la penetración de microelectrodos capaces de inducir y registrar corrientes iónicas (fig. VE 7-1). Para su sorpresa, Kanno y Loewenstein observaron que cuando se inyectaban iones en el núcleo de una célula, el flujo de iones (medido como corriente eléctrica) se propagaba dentro del citoplasma de la célula inyectada y también fluía directo al interior del citoplasma de la célula adyacente. En realidad, el potencial registrado en la célula adyacente era casi tan grande como el de la célula donde originalmente se inducía la corriente. Kanno y Loewenstein concluyeron que las células epiteliales de la glándula salival estaban *eléctricamente acopladas* entre sí, término que indica que los iones pueden fluir libremente de una célula a la otra a través de uniones intercelulares de baja resistencia.³ Si los pequeños iones inorgánicos pueden pasar a través de estas uniones entre las células vecinas, ¿qué ocurre con sustancias de mayor tamaño? Cuando se inyectó un pequeño volumen de iones fluorescentes de fluoresceína (peso molecular de 376 daltons) en el citoplasma de una célula mediante una micropipeta, la fluorescencia se difundió con rapidez hacia las células adyacentes hasta que toda la capa epitelial brillaba por la presencia del trazador (como en la figura 7-32). En contraste, de las células no se salió colorante fluorescente alguno hacia el medio externo, lo que indica que las moléculas de fluoresceína difundían directo del citoplasma de una célula al interior del citoplasma de las células adyacentes por medio de contactos permeables de célula a célula.⁴ Pronto se efectuaron observaciones similares en varios tipos diferentes de células epiteliales y mesenquimatosas, incluyendo las de varios mamíferos; esto indica que tales uniones comunicantes están muy ampliamente difundidas.

El descubrimiento de que la célula contiene sitios en su superficie que permiten el libre intercambio de sustancias con las células vecinas desafió el concepto bien establecido de que las células eran unidades independientes completamente aisladas de su medio exterior. Los estudios de microscopia electrónica demuestran que la superficie de la célula está rodeada por una membrana plasmática continua, pero la estructura de esta membrana se altera de alguna manera en las regiones donde las células hacen contacto con otras células. De otra manera, sería imposible para las sustancias desplazarse directo del citoplasma de una célula al interior de otra. En 1967, Jean Paul Revel y M. J. Karnovsky⁵ descubrieron uniones intercelulares que contienen canales entre células en estrecha aposición. Las micrografías electrónicas de estas uniones mostraron una hendidura distinguible entre células adyacentes, lo que llevó a los investigadores a darles el nombre de "uniones



FIGURA VE 7-1. Micrografía que muestra la instalación de microelectrodos de registro en células vivientes del túbulo de Malpighi de una célula de insecto. (Cortesía de Werner R. Loewenstein.)

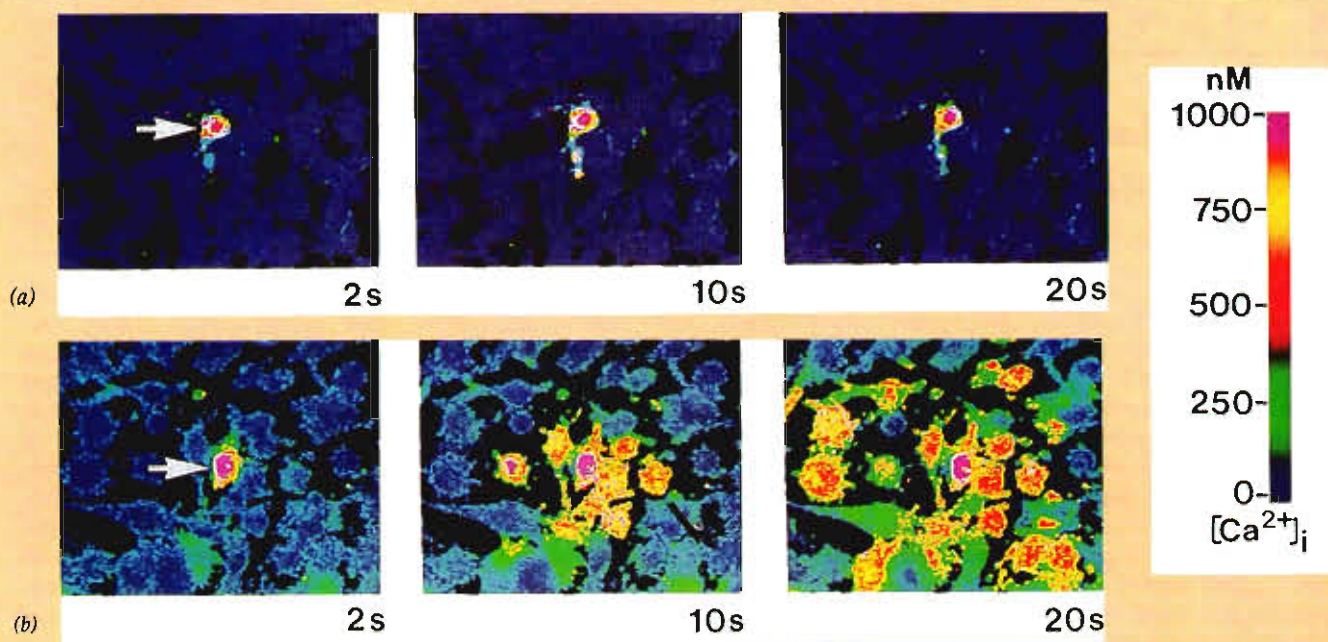
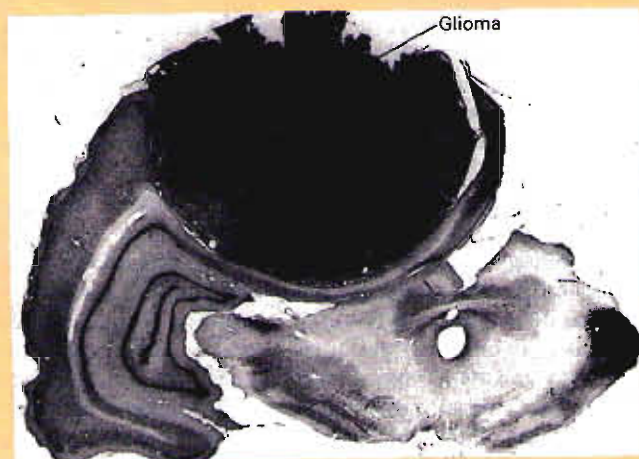


FIGURA VE 7-2. Ondas de calcio inducidas por estimulación mecánica en: *a)* un cultivo testigo de células de un glioma C6 de rata, y *b)* una clona de las mismas células mostradas en *a*, pero a la cual se le ha transfectado DNA *conexina43*. El DNA inyectado se transcribe y traduce en las células transfectadas y las moléculas de la proteína *conexina* se incorporan a la membrana plasmática. Cuando se estimula mecánicamente una de las células no transfectadas hay muy poco paso de Ca^{2+} a sus vecinos; en contraste, cuando las células que expresan el gen *conexina* se estimulan mecánicamente, pasa una onda de Ca^{2+} de una célula a otra a través de las uniones de abertura formadas por la proteína *conexina43*. (Según Andrew C. Charles y cols. *J. Cell Biol.* 118:197, 1992; con permiso de Rockefeller University Press.)

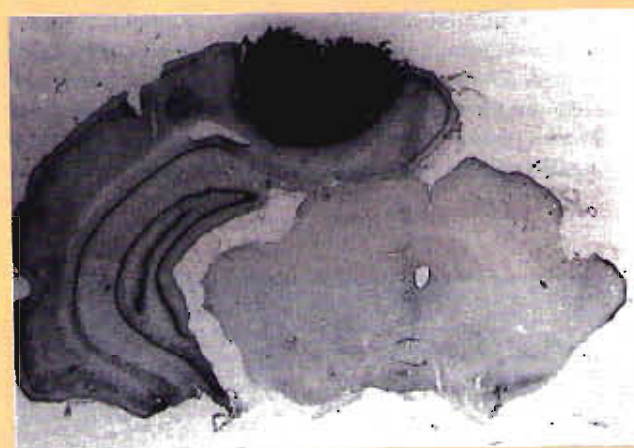
de abertura" para distinguirlas de las uniones herméticas donde las células adyacentes entran en contacto directo.

Se han efectuado varios estudios para saber más acerca del tamaño de los canales que conectan el citoplasma de células

adyacentes. En el laboratorio de Loewenstein se probaron sondas fluorescentes unidas a péptidos de longitud variable. Se observó que moléculas mayores de 1 200 daltons podían difundir entre las células de las glándulas salivales de larvas



(a)



(b)

FIGURA VE 7-3. *a)* Cuando una pequeña masa de células de un glioma C6 se implantó en el cerebro de una rata, las células se desarrollaron en una gran masa tumoral luego de dos semanas de crecimiento. *b)* Las mismas células que se han transfectado con DNA *conexina43* y que se presume participan en la comunicación intercelular a través de las uniones de abertura se desarrollan en una masa tumoral mucho más pequeña durante un periodo similar. (Según Christian G. Naus y cols. *Cancer Res.* 52:4210, 1992.)

de insectos.⁶ Según estimaciones del tamaño de estas moléculas, los investigadores concluyeron que el diámetro interno del canal era alrededor de 10 a 15 Å (1.0 a 1.5 nm), valor que concuerda estrechamente con el estimado por micrografía de alta resolución de las uniones de abertura tomadas con microscopio electrónico.⁷

PAPEL DE LAS UNIONES DE ABERTURA EN EL CÁNCER

Una de las primeras cuestiones consideradas por Kanno y Loewenstein luego de su descubrimiento de los contactos intercelulares permeables fue si este mismo tipo de contacto estaba presente en las células cancerosas. Se sabía que el índice de crecimiento de las células normales era influido por estímulos procedentes de su ambiente. Tal vez uno de los factores que permitieron a las células cancerosas apartarse de los mecanismos de control del crecimiento que prevalece en las células normales era la pérdida de su capacidad para recibir moléculas reguladoras de sus células vecinas. Kanno y Loewenstein investigaron esta posibilidad midiendo el flujo de corriente iónica en tejido hepático normal en comparación con el flujo entre células de varios tumores hepáticos. Se pudo descubrir corriente iónica que fluía con rapidez entre las células del hígado normal de una rata, pero no hubo paso de corriente entre las células de ninguno de los tumores hepáticos investigados.⁸

A partir de estos estudios iniciales se han analizado cientos de células cancerosas de diferente tipo en relación con su capacidad para efectuar comunicación intercelular por uniones de abertura. Se ha notado que los resultados iniciales de Loewenstein y Kanno siguen siendo válidos para la mayor parte, pero no para todas las células cancerosas investigadas.^{9,10} No es sorprendente que no todas las células cancerosas muestren las mismas propiedades en relación con la comunicación intercelular por uniones de abertura. La conversión de una célula normal a célula maligna es un fenómeno de múltiples etapas que pueden ocurrir como resultado de cambios en una gran variedad de genes diferentes (capítulo 16). Está claro que hay diferentes mecanismos por los cuales una célula puede perder el control del crecimiento. Algunos de estos mecanismos parecen implicar la pérdida de la capacidad de las células para transmitir señales a través de las uniones de abertura. En los tumores donde ocurre esto, a menudo hay pérdida progresiva de comunicación intercelular por uniones de abertura conforme la célula se maligniza cada vez más.¹¹ Además, hay correlación entre la pérdida de comunicación intercelular por uniones de abertura y el incremento del potencial metastático de una población de células.¹² El potencial metastático es una propiedad que requiere que las células cancerosas ignoren a las células adyacentes y avancen por sí solas; por lo tanto, no es sorprendente que esta conducta requiera que una célula interrumpa sus vías de comunicación con las células vecinas.

Los datos obtenidos por correlación entre una situación (o sea, pérdida de comunicación intercelular por uniones de abertura) y otra (o sea, malignidad) quizá sólo sean circunstanciales. La mejor prueba de una relación causal directa entre las dos

situaciones proviene de estudios en los cuales se "obliga" a las células cancerosas a expresar proteínas de unión de abertura (conexinas) por microinyección de moléculas de DNA que codifican dichas proteínas. Cuando a las células glioma C6, un tipo de células de tumor cerebral, se les inyecta DNA que codifica la proteína conexina43, se incrementa de manera espectacular la comunicación intercelular por uniones de abertura entre las células tumorales (fig. VE 7-2), con disminución correspondiente de la tasa de división celular.¹³ De igual manera, cuando las células glioma C6 que se les ha transferido DNA que codifica conexina43 son implantadas en el cerebro de ratas adultas, generan tumores mucho más pequeños que las células glioma a las cuales no se les ha transferido DNA (fig. VE 7-3).¹⁴ Estos datos apoyan el papel propuesto de comunicación intercelular por uniones de abertura en el crecimiento de tumores cerebrales. Si los defectos en este tipo de unión desempeñan un papel en la formación de tumores, entonces se deben obtener datos mediante mutaciones en genes que afectan la estructura y función de la **unión** de abertura. Con esta idea en mente, se han iniciado ahora estudios de detección de mutaciones de conexinas en tumores humanos.¹⁵

BIBLIOGRAFÍA

1. Furshpan, E.J. y Potter, D.D. 1957. Mechanism of nerve-impulse transmission at a crayfish synapse. *Nature* 180:342-343.
2. Furshpan, E.J. y Potter, D.D. 1964. Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J. Physiol.* 145:289-325.
3. Kanno, Y. y Loewenstein, W.R. 1964. Low-resistance coupling between gland cells: Some observations on intercellular contact membranes and intercellular space. *Nature* 201:194-195.
4. Kanno, Y. y Loewenstein, W.R. 1964. Intercellular diffusion. *Science* 143:959-960.
5. Revel, J.P. y Karnovsky, M.J. 1967. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J. Cell Biol.* 33:C7-C12.
6. Simpson, I., Rose, B. y Loewenstein, W.R. 1977. Size limit of molecules permeating the junctional membrane channels. *Science* 195:294-296.
7. Caspar, D.L.D. y cols. 1977. Gap junction structures: I. Correlated electron microscopy and x-ray diffraction. *J. Cell Biol.* 74:605-628.
8. Loewenstein, W.R. y Kanno, Y. 1966. Intercellular communication and the control of tissue growth: Lack of communication between cancer cells. *Nature* 209:1248-1249.
9. Yamasaki, Y. 1990. Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11:1051-1058.
10. Holder, J.W., Elmore, E. y Barrett, J.C. 1993. Gap junction function and cancer. *Cancer Res.* 53:3475-3485.
11. Klann, R. y cols. 1989. Gap-junction intercellular communication in epidermal cell lines from selected stages of SENC mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 49:699-705.
12. Nicolson, G. 1987. Tumor cell instability, diversification, and progression, to the metastatic phenotype. *Cancer Res.* 47:1473-1487.
13. Charles, A.C. y cols. 1992. Intercellular calcium signaling via gap junctions in glioma cells. *J. Cell Biol.* 118:195-201.
14. Naus, C.C.G. y cols. 1992. In vivo growth of C6 glioma cells transfected with connexin43 cDNA. *Cancer Res.* 52:4208-4213.
15. Evans, W.H. 1994. Hiroshima welcomes gap junction communicants. *Trends Cell Biol.* 4:26-29.

SINOPSIS

El espacio extracelular se extiende por fuera de la superficie externa de la membrana plasmática y contiene varios materiales secretados que influyen en la conducta de las células. El glucocáliz incluye porciones carbohidrato de glucoproteínas y glucolípidos de la membrana junto con proteínas y polisacáridos relacionados que protegen la célula y gobiernan sus interacciones con sustratos no vivos y otras células. Los tejidos epiteliales se apoyan sobre una membrana basal que consta de una delgada red entrelazada de materiales extracelulares. Varios tipos de tejido conectivo, incluyendo tendones, cartílago y el estroma corneal, contienen una matriz extracelular expansiva que confiere al tejido sus propiedades características. (p. 239).

Los principales componentes de las matrices extracelulares incluyen colágeno, proteoglicanos y una variedad de proteínas, como fibronectina, laminina y tenascinas. Cada proteína de la matriz extracelular tiene una estructura modular compuesta de dominios que contienen sitios de enlace para unir una célula con otra y receptores sobre la superficie celular. Como resultado, estos diferentes materiales extracelulares interactúan para formar una red interconectada unida a la superficie celular. La colágena consiste en proteínas fibrosas muy abundantes que confieren a la matriz extracelular capacidad para resistir fuerzas de tensión. Los proteoglicanos constan de un núcleo de proteína al cual se unen cadenas de glucosaminoglicanos con carga negativa. A su vez, los proteoglicanos individuales pueden juntarse en complejos masivos sumamente hidratados que sirven como material amorfo de empaque que llena el espacio extracelular (p. 241).

Las integrinas son receptores de la superficie celular implicadas en interacciones dependientes de calcio entre las células y su sustrato. Las integrinas son proteínas integrales de membrana heterodiméricas cuyos dominios citoplásmicos pueden interactuar con los componentes del citoesqueleto y sus dominios extracelulares a veces contienen sitios de enlace para varios materiales extracelulares. Los materiales extracelulares que se enlazan a las integrinas lo hacen por enlace al tripéptido RGD. El enlace de un ligando extracelular a una integrina puede enviar señales al interior de la célula y desencadenar cambios en las actividades celulares (p. 247).

Las células se fijan a su sustrato por medio de sitios especializados en la superficie celular, como contactos focales y hemidesmosomas. Los contactos focales son sitios donde las células cultivadas se fijan a la superficie del plato de cultivo. La membrana plasmática de un contacto focal contiene agrupamientos de integrinas cuyos dominios citoplásmicos están unidos a microfilamentos del citoesqueleto que contiene actina. Los hemidesmosomas son sitios de unión de células *in vivo* a una membrana basal subyacente. En un hemidesmosoma, la membrana plasmática contiene grupos de integrinas conectados a la membrana basal sobre su superficie externa y a filamentos intermedios que contienen queratina sobre la superficie interna (p. 249).

La adherencia de células a otras células es mediada por varias familias distintas de proteínas integrales de membrana: selectinas, integrinas, cadherinas y miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (IgSF). Las selectinas se enlazan a disposiciones específicas de grupos de carbohidratos que sobresalen de la superficie de otras células y median interacciones transitorias dependientes de calcio entre leucocitos circulantes y las paredes de los vasos sanguíneos en sitios de inflamación y coagulación. Las moléculas de adherencia celular de la superfamilia Ig son mediadoras de la adherencia célula a célula independiente de calcio, como se ejemplifica con moléculas de adherencia a células neurales, que desempeñan un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso. Una proteína IgSF sobre una célula puede interactuar con una integrina o con la misma, o con otra proteína IgSF de otra célula. Las cadherinas median la adherencia célula a célula dependiente de calcio al unirse a la misma especie de cadherina en la célula opuesta, y por lo tanto facilitan la formación de tejidos compuestos de tipos similares de células. Las cadherinas pueden ser particularmente importantes durante el desarrollo embrionario, según se puede ejemplificar por su papel en la conversión de células mesenquimatosas en epiteliales. Además de su papel en la adherencia celular, todas estas proteínas tienen potencial para actuar como intermediarias en las señales transmembrana (p. 251).

La firme adherencia entre las células se facilita por la formación de uniones adherentes especializadas y desmosomas. Las uniones adherentes rodean una célula cerca de su superficie apical, lo que permite el contacto entre la célula y todas sus vecinas que la rodean. Las membranas plasmáticas de las uniones adherentes contienen núcleos de cadherinas que forman contactos adherentes entre sí en el espacio extracelular situado entre la superficie de las células. Los dominios citoplásmicos de las cadherinas se unen por medio de proteínas intermedias a los filamentos de actina del citoesqueleto. Los desmosomas son placas entre las células caracterizados por una concentración de materiales extracelulares entre las membranas plasmáticas y las placas citoplásmicas densas sobre la superficie interna de la membrana. Los desmosomas son sitios de concentración de proteínas integrales de la familia cadherina que se cree conectan el material extracelular situado entre las membranas plasmáticas en aposición con filamentos intermedios de las placas citoplásmicas (p. 256).

Las uniones herméticas son sitios especializados de contacto que impiden la difusión de solutos entre las células a través del epitelio. Una sección transversal a través de las uniones herméticas muestra que la superficie externa de las células adyacentes entra en contacto directo en sitios intermitentes. El examen de la membrana por fracturas por congelación muestra los sitios que contienen hileras de partículas alineadas que forman fibras dentro de las membranas plasmáticas de células adyacentes (p. 262).

Uniones de abertura y plasmodesmosomas son sitios especializados de comunicación entre células adyacentes en ani-

males y vegetales, respectivamente. Las membranas plasmáticas de células adyacentes en la región de la unión de abertura contienen canales formados en disposición hexagonal de subunidades de conexina que forman un conexón. El conexón de una membrana se encuentra a la misma altura que el conexón de la membrana adyacente y forma un conducto central que conecta el citoplasma de una célula con el citoplasma de la célula adyacente. El conducto central de un conexón tiene un diámetro aproximado de 1.5 nm, que permite la difusión directa entre las células de sustancias hasta de unos 1 000 daltons. El paso de corrientes iónicas a través de las uniones de abertura desempeña un papel crítico en numerosos procesos fisiológicos, incluyendo la propagación de la excitación a través del tejido muscular cardíaco y del tejido muscular liso en la pared del conducto digestivo. Los plasmodesmosomas son canales citoplásmicos cilíndricos que se extienden entre células vegetales adyacentes directamente a través de la pared celular interpuesta. Estos canales, que de ordinario contienen un túbulo

membranoso en forma de barra, permiten el libre paso de moléculas de soluto de unos 1 000 daltons o menos (p. 262).

Las células vegetales están rodeadas por una compleja pared celular compuesta de varios materiales secretados que le suministran apoyo mecánico y la protegen de influencias potencialmente nocivas. Las microfibrillas de celulosa, compuestas de haces de moléculas de celulosa y secretadas por enzimas que residen dentro de la membrana plasmática, proporcionan rigidez y resistencia a la tracción. Las moléculas de hemicelulosa actúan para entrelazar transversalmente a las fibras de celulosa, en tanto que las pectinas, una clase heterogénea de polisacáridos con carga negativa, forman un gel extensamente unido que llena los espacios situados entre los elementos fibrosos de las paredes celulares. Igual que la matriz extracelular de las células animales, las paredes de las células vegetales son estructuras dinámicas que pueden modificarse en respuesta a cambios en las condiciones ambientales (p. 266).

PREGUNTAS DE REPASO

1. Distinguir entre glucocáliz, membrana basal y matriz extracelular de tejido cartilaginoso.
2. Contrastar el papel de colágena, proteoglicanos y fibronectina en el espacio extracelular.
3. Elaborar una lista de unas cuantas funciones de la matriz extracelular en tejidos animales.
4. ¿Qué tipos de proteína integral de membrana desempeñan un papel clave en la mediación de interacciones entre la superficie celular y la matriz extracelular? ¿Entre las superficies celulares de células vecinas? ¿Cuál de estas interacciones requiere la presencia de Ca^{2+} o Mg^{2+} ?
5. ¿Cuál es la diferencia entre el proteoglicano de la matriz cartilaginosa en cuanto a estructura y función, y el sindecano de la superficie celular?
6. ¿Cómo puede una proteína de la superficie celular participar tanto en la adherencia celular como en la transducción de señales a través de la membrana?
7. Distinguir entre un contacto focal y un hemidesmosoma; un hemidesmosoma y un desmosoma; un desmosoma y una unión adherente.
8. ¿Qué tipo(s) de uniones intercelulares contienen filamentos de actina? ¿Cuáles contienen filamentos intermedios? ¿Cuáles contienen integrinas? ¿Cuáles contienen cadherinas?
9. ¿Qué datos nos suministra el análisis de una fractura por congelación acerca de la estructura de una unión, que no pueden obtenerse por el examen de cortes de tejido teñidos?
10. Comparar la disposición de las proteínas integrales de membrana en la unión hermética en comparación con la unión de abertura.
11. ¿En qué son similares los plasmodesmosomas y las uniones de abertura? ¿En qué son diferentes? ¿Se podría esperar que una proteína de tamaño moderado pase a través del plasmodesmosoma?
12. Describir los componentes que constituyen la pared de una célula vegetal y el papel de cada uno en la estructura y función de la pared.

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. La adherencia de las células a menudo se puede impedir *in vitro* tratando las células con agentes específicos. ¿Cuál de las siguientes sustancias se podría esperar que impidiera la adherencia de células mediada por selectinas? ¿Con la adherencia de células mediada por moléculas de adherencia a células neurales? Las sustancias son tripsina, que digiere proteínas; un péptido, que contiene RGD; neuraminidasa, que elimina ácido siálico de un oligosacárido; colagenasa, que digiere colágena; hialuronidasa, que digiere ácido hialurónico; EGTA, que se enlaza a iones Ca^{2+} en el medio.
2. ¿Qué sustancia se podría añadir a un cultivo para impedir la migración de las células de la cresta neural? ¿Para evitar el crecimiento de un axón? ¿Para suprimir la adherencia de fibroblastos al sustrato?
3. En el texto se hizo notar que los ratones que carecen de un gen para fibronectina no sobreviven durante las primeras etapas del desarrollo embrionario. Mencione dos procesos que se interrumpen en esos embriones.
4. ¿Cómo piensa usted que cambiarían las propiedades del cartílago si careciera de una matriz extracelular? ¿Cómo afectaría esto a las propiedades del estroma corneal, o a las propiedades de un tendón?
5. ¿En qué son similares las matrices extracelulares de los animales y las paredes celulares de las plantas en cuanto a su estructura?
6. Ya se mencionó que dos diferentes enfermedades por autoinmunidad, una que produce anticuerpos contra un componente de los hemidesmosomas y otra que produce

anticuerpos contra un componente de los desmosomas, causan ampollas graves en la piel. ¿Por qué se pensaría que estas dos enfermedades tienen síntomas similares?

7. ¿Cuál de los diferentes tipos de moléculas que median la adherencia celular es más probable que se encargue de la especie de clasificación mostrada por las células de la figura 7-19? ¿Por qué? ¿Cómo se podría demostrar esa conclusión?
8. FSH es una hormona hipofisaria que actúa sobre las células foliculares del ovario para iniciar la síntesis de AMP cíclico que estimula varios cambios metabólicos. Normalmente, FSH no tiene efectos sobre células musculares cardíacas. Sin embargo, cuando se desarrollan juntas las células del folículo ovárico y las células musculares cardíacas en un cultivo mixto se observa que algunas células musculares cardíacas se contraen después de añadir FSH al medio. ¿Cómo puede explicarse esta observación?
9. En la primera descripción de uniones de abertura se emplearon tejidos sumergidos en una solución de sales de lantano. Considerando el modelo de la figura 7-31, ¿cómo

cree usted que este tratamiento ayudó a revelar la presencia de las uniones de abertura? Utilizando un procedimiento similar, ¿en qué sería diferente una unión de abertura de una unión hermética?

10. ¿Por qué sería de esperar que disminuyendo la temperatura del medio en el cual crecen las células se afectara la capacidad de las mismas para formar uniones de abertura entre sí?
11. Algunas de las uniones intercelulares ocurren como cinturones que abarcan a la célula, en tanto que otras ocurren como placas discretas. ¿Cómo se correlacionan estos dos tipos de arreglos estructurales con las funciones de las respectivas uniones?
12. Proponer algún mecanismo que pueda explicar por qué el virus del mosaico del tabaco puede alterar la permeabilidad de un plasmodesmosoma. ¿Cómo podría usted demostrar su proposición?
13. ¿Por qué piensa usted que las células animales pueden sobrevivir sin el tipo de paredes celulares que se observan en las células de casi todos los otros grupos de organismos?

BIBLIOGRAFÍA

La matriz extracelular

- Adair, W.S. y Mecham, R.P. 1990. *Organization and Assembly of Plant and Animal Extracellular matrices*. Academic Press.
- Beck, K., Hunter, L. y Engel, J. 1990. Structure and function of laminin: Anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J.* 4:148-151.
- Boudreau, N., Myers, C. y Bissell, M.J. 1995. From laminin to lamin: regulators of tissue-specific gene expression by the ECM. *Trends Cell Biol.* 5:1-4.
- Burgeson, R.E. 1988. New collagens, new concepts. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4:551-577.
- D'Souza, S.E., Ginsberg, M.H. y Plow, E.E. 1991. Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): A cell adhesion motif. *Trends Biochem. Sci.* 16:246-250.
- Hay, E.D. 1991. *Cell Biology of the Extracellular Matrix*. 2a. edición, Plenum.
- Hilkens, J. y cols. 1992. Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. *Trends Biochem. Sci.* 17:359-363.
- Horwitz, A.F. y Thiery, J.P. eds. 1994. Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:645-758.
- Inoue, S. 1989. Ultrastructure of basement membranes. *Int. Rev. Cytol.* 117:57-98.
- Kjellen, L. y Lindahl, U. 1991. Proteoglycans: Structures and interactions. *Ann. Rev. Biochem.* 60:443-475.
- Kucharz, E.J. 1992. *The Collagens: Biochemistry and Pathology*. Springer-Verlag.
- Martin, G.R. y Timpl, R. 1987. Laminin and other basement membrane components. *Ann. Rev. Cell Biol.* 3:57-85.
- Martin, G.R., Timpl, R. y Kuhn, K. 1988. Basement membrane proteins. *Adv. Prot. Chem.* 39:1-50.
- Mayne, R. y Burgeson, R.E. 1987. *Structure and Function of Collagen Types*. Academic Press.
- McDonald, J.A. 1988. Extracellular matrix assembly. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4:183-207.

McDonald, J.A. y Mecham, R.P. eds. 1991. *Receptors for Extracellular Matrix*. Academic Press.

- Mecham, R.P. 1991. Laminin receptors. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7:71-91.
- Nimni, M. ed. *Collagen: Biochemistry, Biomechanics, Biotechnology*, vols. 1-5, CRC Press.
- Preissner, K.T. 1991. Structure and biological role of vitronectin. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7:275-310.
- Ruoslahti, E. 1988. Structure and biology of proteoglycans. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4:229-255.
- Shimizu, Y. y Shaw, S. 1993. Mucins in the mainstream. *Nature* 366:630-631.

Moléculas de adherencia celular

- Bernfield, M. y cols. 1992. Biology of the syndecans: A family of trans-membrane heparin sulfate proteoglycans. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8:365-393.
- Bevilacqua, M.P. y Nelson, R.M. 1993. Selectins. *J. Clin. Invest.* 91:379-387.
- Bongard, P. y cols., eds. 1995. *Studying Cell Adhesion*. Springer-Verlag.
- Bronner-Fraser, M. 1994. Neural crest cell formation and migration in the developing embryo. *FASEB J.* 8:699-706.
- Cross, J.C., Werb, Z. y Fisher, S.J. 1994. Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle. *Science* 266:1508-1515.
- Cummings, R.D. y Smith, D.F. 1992. The selectin family of carbohydrate-binding proteins. *Bioess.* 14:849-856.
- Drickamer, K. y Taylor, M.E. 1993. Biology of animal lectins. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9:237-264.
- Erbe, D.V. 1993. P- and E-selectins use common sites for carbohydrate ligand recognition and cell adhesion. *J. Cell Biol.* 120:1227-1235.
- Geiger, B. y Ayalon, O. 1993. Cadherins. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8:307-332.
- Gumbiner, B.M. y Yamada, K.M. eds. 1993. Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:769-906.
- Heidemann, S.R. 1993. A new twist on integrins and the cytoskeleton. *Science* 260:1080-1081.

Hinck, L. y cols. 1994. β -catenin: A common target for the regulation of cell adhesion by Wnt-1 and Src signaling pathways. *Trends Biochem. Sci.* 19:538-543.

Humphries, M.J., Mould, A.P. y Tuckwell, D.S. 1993. Dynamic aspects of adhesion receptor functions: *Bioess.* 15:391-397.

Hynes, R.O. 1992. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.

Juliano, R.L. y Haskill, S. 1993. Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 120:577-585.

Kincaide, P.W. 1993. Sticking to the point. *Nature* 361:15-16.

Luna, E.J. y Hitt, A.L. 1992. Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science* 258:955-964.

Patel, D.J. y Gumbiner, B.M. 1995. Zipping together a cell adhesion interface. *Nature* 374:306-307.

Peifer, M. 1993. Cancer, catenins, and cuticle patterns: A complex connection. *Science* 262:1667-1668.

Reichardt, L. y Tomaselli, K.J. 1991. Extracellular matrix molecules and their receptors: Functions in neural development. *Ann. Rev. Neurosci.* 14:531-570.

Ruoslahti, E. 1991. Integrins. *J. Clin. Invest.* 87:1-5.

Springer, T.A. y Laskey, L.A. 1991. Sticky sugars for selectins. *Nature* 349:196-197.

Takeichi, M. 1990. Cadherins: A molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Ann. Rev. Biochem.* 59:237-252.

Takeichi, M. 1991. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251:1451-1455.

Travis, J. 1993. Biotech gets a grip on cell adhesion. *Science* 260:906-908.

Williams, J. y Kieffer, N. 1994. Adhesion molecules in cellular interactions. *Trends Cell Biol.* 4:102-104.

Yamada, K.M. 1991. Adhesive recognition sequences. *J. Biol. Chem.* 266:12089-12812.

Inflamación y metástasis

Albelda, S.M., Smith, C.W. y Ward, P.A. 1994. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 8:504-512.

Butcher, E.C. 1990. Cellular and molecular mechanisms that direct leukocyte traffic. *Amer. J. Pathol.* 136:3-11.

Dustin, M.L. y Springer, T.A. 1991. Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Ann. Rev. Immunol.* 9:27-66.

Hemler, M.E. 1990. VLA proteins in the immunoglobulin family: Structures, functions, and their role on leukocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 8:365-400.

Hogg, N. 1992. Roll, roll, roll your leukocyte gently down the vein. *Immunol. Today* 13:113-115.

Luscinskas, F.W. y Lawler, J. 1994. Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEB J.* 8:929-938.

Springer, T.A. 1990. The sensation and regulation of interactions with the extracellular environment: The cell biology of lymphocyte adhesion receptors. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6:359-402.

Takeichi, M. 1993. Cadherins in cancer: Implications for invasion and metastasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:806-811.

Zimmerman, G.A. y cols. 1992. Leucocyte-endothelial interactions. *Immunol. Today* 13:93-112.

Uniones intercelulares

Bennett, M.V.L. 1994. Connexins in disease. *Nature* 368:18-19.

Bennett, M.V.L. y cols. 1991. Gap junctions: New tools, new answers, new questions. *Neuron* 6:305-320.

Beyer, E.C., Paul, D.L. y Goodenough, D.A. 1990. Connexin family of gap junction proteins. *J. Memb. Biol.* 116:187-194.

Beyer, E.C. 1993. Gap junctions. *Int. Rev. Cytol.* 137C:1-37.

Cerejeido, M., ed. 1992. *Tight Junctions*. CRC Press.

Citi, S. 1993. The molecular organization of tight junctions. *J. Cell Biol.* 121:485-491.

Citovsky, V. y Zambryski, P. 1991. How do plant virus nucleic acids move through intercellular connections? *Bioess.* 13:373-379.

DeMello, W.C., ed. 1987. *Cell-to-Cell Communication*. Plenum.

Dermeietzel, R. y Spray, D.C. 1993. Gap junctions in the brain: Where, what type, how many, and why? *Trends Neurosci.* 16:186-192.

Evans, W.H. 1994. Hiroshima welcomes gap junction communicants. *Trends Cell Biol.* 4:26-29.

Furini, M. y cols. 1993. Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123:1777-1788.

Gumbiner, B.M. 1993. Breaking through the tight junction barrier. *J. Cell Biol.* 123:1631-1633.

Legan, P.K., Collins, J.E. y Garrod, D.R. 1992. The molecular biology of desmosomes and hemidesmosomes: What's in a name? *Bioess.* 14:385-393.

Lucas, W.J. y Wolf, S. 1993. Plasmodesmata: The intercellular organelles of green plants. *Trends Cell Biol.* 3:308-315.

Rubin, L.L. 1992. Endothelial cells: Adhesion and tight junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:830-833.

Scharz, M.A. y cols. 1990. Desmosomes and hemidesmosomes: Constitutive molecular components. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6:461-491.

Schlosshauer, B. 1993. The blood brain barrier: Morphology, molecules, and neurothelin. *Bioess.* 15:341-346.

Schneeberger, E.E. y R.D. Lynch. 1992. Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Amer. J. Physiol.* 262:L647-L661.

Tilney, L.G. y cols. 1991. The structure of plasmodesmata as revealed by plasmolysis, detergent extraction, and protease digestion. *J. Cell Biol.* 112:739-747.

Paredes celulares

Bolwell, G.P. 1993. Dynamic aspects of the plant extracellular matrix. *Int. Rev. Cytol.* 46:261-324.

Delmer, D.P. 1987. Cellulose biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38:259-290.

Gibeant, D.M. y Carpita, N.C. 1994. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. *FASEB J.* 8:904-915.

Levy, S. y Staehelin, L.A. 1992. Synthesis, assembly, and function of plant cell wall macromolecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:856-862.

Roberts, K. 1994. The plant extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:688-694.

Varner, J.E. y Lin, L.-S. 1989. Plant cell wall architecture. *Cell* 56:231-239.

Sistemas de la membrana citoplásmica: estructura, función y tráfico de membrana

8-1 Naturaleza dinámica del sistema endomembrana

8-2 Algunas técnicas para el estudio de las citomembranas

8-3 Retículo endoplásmico

8-4 El complejo de Golgi

8-5 Lisosomas



8-6 Vacuolas de células vegetales

La perspectiva humana: Enfermedades producidas por defectos de la función lisosómica

8-7 Captación celular de partículas y macromoléculas

La vía experimental: Endocitosis mediada por receptores

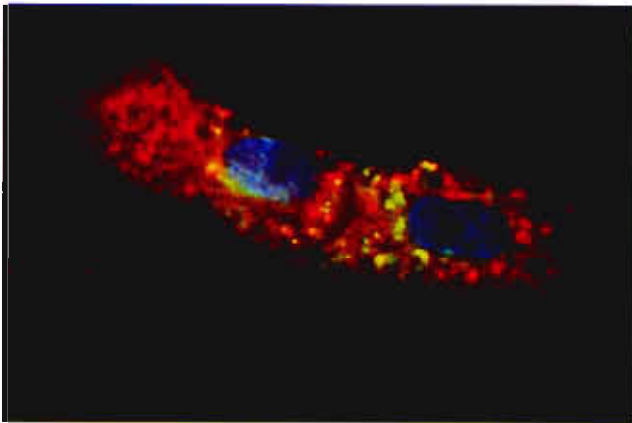


FIGURA 8-A. En esta micrografía se indican varios elementos del sistema endomembrana de un par de células epiteliales cultivadas, teñidas con anticuerpos fluorescentes para mostrar la presencia del retículo endoplásmico (verde) y de los endosomas (rojo). El núcleo aparece en azul. (Cortesía de Katrina Allen, Mary Rycowski y Jean Wilson, Universidad de Arizona.)

Observado con microscopio de luz, el citoplasma de casi todas las células vivientes parece relativamente desprovisto de estructura. Incluso antes que empezara el siglo XX, el examen de cortes de tejido teñidos indicaba la existencia de una extensa red membranosa dentro del citoplasma. Sin embargo, no fue sino hasta el desarrollo del microscopio electrónico, en el decenio de 1940, que los biólogos comenzaron a apreciar las diversas disposiciones de las estructuras membranosas presentes en el citoplasma de la mayor parte de las células eucariotas. Los primeros investigadores en microscopía electrónica observaron vesículas rodeadas de membrana de diámetros diferentes que contenían materiales de diversa densidad electrónica; largos canales enlazados por membranas que se ramifican a través del citoplasma para formar una red interconectada de conductos, y pilas de sacos aplanados rodeados de membranas llamadas *cisternas*.

De los primeros estudios con microscopía electrónica y de las investigaciones bioquímicas que siguieron cada vez fue más evidente que el citoplasma de las células eucariotas estaba subdividido en varios compartimientos rodeados por barreras membranosas. A medida que se examinaron más tipos de células se demostró que las estructuras membranosas del citoplasma formaban distintos organelos identificables en diversas células, desde levaduras hasta plantas y animales evolutivamente desarrollados. Lo extenso de las estructuras membranosas que ocupan el citoplasma de una célula eucariota se ilustra en la micrografía de una célula de la raíz de una planta de maíz mostrada en la figura 8-1.

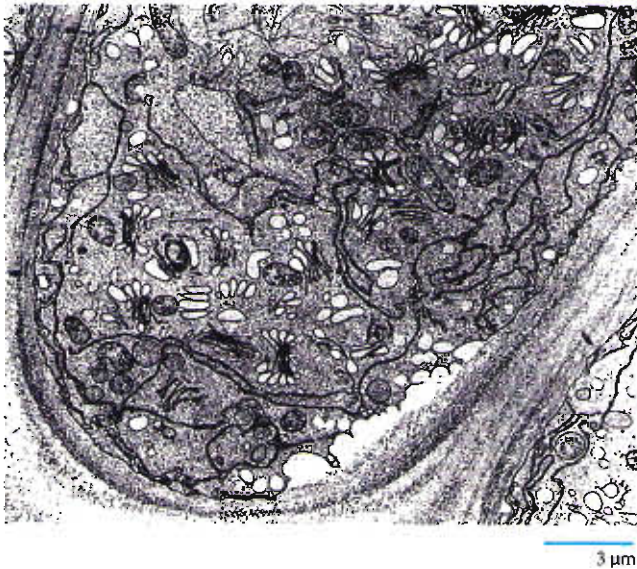


FIGURA 8-1. Organelos membranosos citoplásmicos. El citoplasma de esta célula de la cubierta de la raíz de una planta de maíz tiene diversa disposición de organelos membranosos. En este capítulo examinaremos la estructura y función de muchos de estos organelos. (Cortesía de Hilton H. Mollenhauer.)

En el presente capítulo estudiaremos la estructura y las funciones del retículo endoplásmico, el complejo de Golgi, los endosomas, lisosomas y vacuolas. Considerados en conjunto, estos organelos membranosos forman un **sistema de endomembranas** estructural y funcionalmente interrelacionadas.¹ Otros organelos membranosos del citoplasma, la mitocondria, los peroxisomas y los cloroplastos, fueron tema de los capítulos precedentes.

8-1 Naturaleza dinámica del sistema endomembrana

Aunque el microscopio electrónico puede suministrar imágenes exquisitamente detalladas de las partes de una célula, inevitablemente son figuras congeladas en el tiempo. Las células ejecutan procesos dinámicos, pero el microscopio electrónico sólo capta escenas estáticas. Por consiguiente, debemos tratar de poner en acción a los organelos de la célula en nuestra propia imaginación. Muchos estudios, algunos de los cuales se analizan en este capítulo, muestran que casi todos los organelos membranosos del citoplasma forman parte de una red dinámica integrada en la cual se intercambian materiales de una parte de la célula a otra en ambos sentidos. En la mayor parte de los casos, los vehículos que llevan materiales entre los organelos, por ejemplo

del retículo endoplásmico al complejo de Golgi, son minúsculas **vesículas de transporte** que se forman por gemación a partir de un compartimento membranoso. Estas vesículas se mueven a través del citoplasma de manera dirigida, con frecuencia a lo largo de vías formadas por elementos del citoesqueleto, y luego se fusionan con la membrana de un compartimento diferente que acepta tanto la carga soluble de la vesícula como su envoltura membranosa (fig. 8-2, b). Ciclos repetidos de gemación y fusión desplazan materiales a lo largo de las vías a través de la célula.

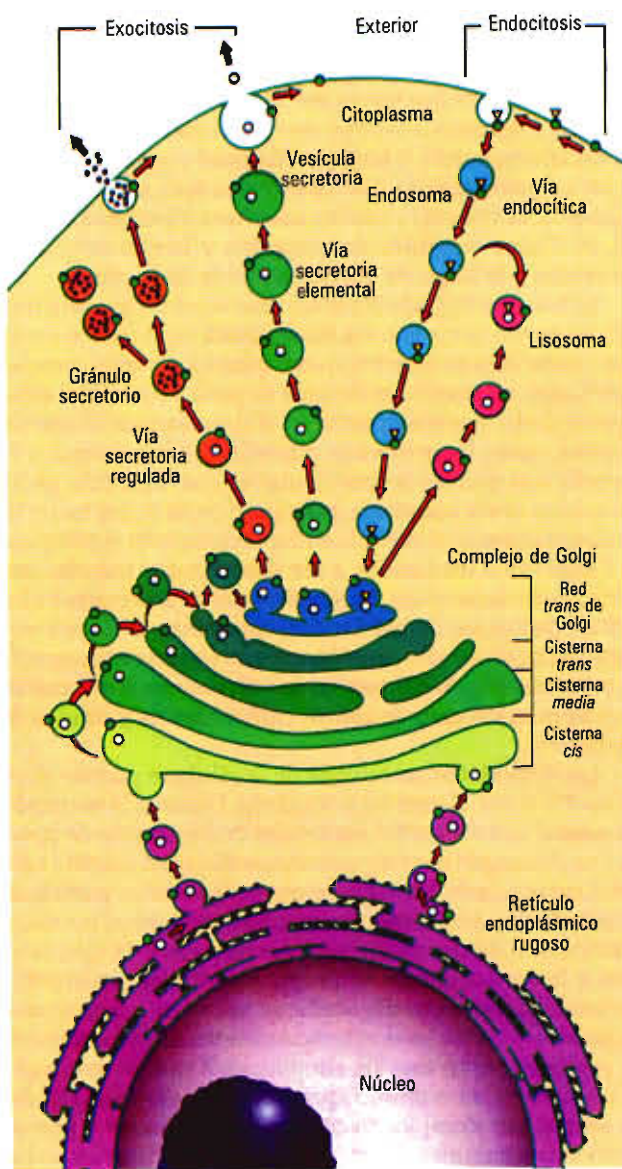
Se han identificado diversas vías en el citoplasma (fig. 8-2). Se puede notar una **vía biosintética** en la cual se sintetizan materiales en el retículo endoplásmico o en el complejo de Golgi, se modifican durante su paso a través del complejo de Golgi y se transportan en el citoplasma a diferentes destinos, como la membrana plasmática, un lisosoma, o la vacuola más grande de una célula vegetal. Esta ruta se conoce como la **vía secretoria**, pues gran parte de los materiales sintetizados en el retículo endoplásmico o en el complejo de Golgi están destinados a ser descargados (**secretados**) hacia afuera de la célula. La vía biosintética secretoria incluye flujo de lípidos, carbohidratos y proteínas. En la primera parte del capítulo sólo consideraremos síntesis y transporte de proteínas (fig. 8-2) y más tarde volveremos al ensamblado y desplazamiento de ciertos carbohidratos y lípidos de membrana.

Las actividades secretorias de la célula se pueden dividir en dos tipos: elemental y regulada. Durante la **secreción elemental** se transportan materiales desde su sitio de síntesis y se descargan en el espacio extracelular de manera continua, no regulada. La mayor parte de las células participan en la secreción elemental, proceso que contribuye no sólo a la formación de matriz extracelular (sección 7-1), sino también a la formación de la propia membrana plasmática. Durante la **secreción regulada** se secretan y almacenan materiales en **gránulos secretorios** rodeados de membrana en las regiones periféricas del citoplasma y sólo se descargan en respuesta a un estímulo apropiado. La secreción regulada ocurre, por ejemplo, en células que producen y liberan hormonas o enzimas digestivas y en células nerviosas que liberan sustancias neurotransmisoras.

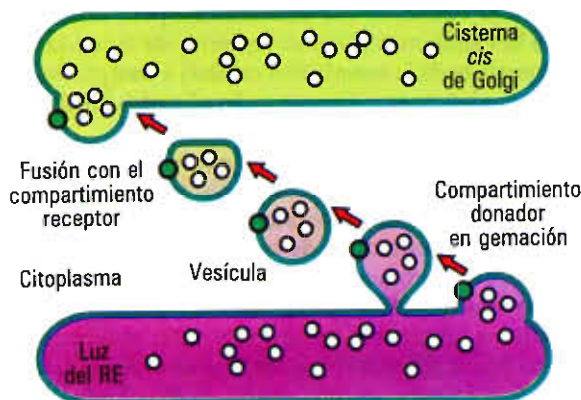
En tanto que la vía secretoria desplaza materiales hacia afuera de la célula, la **vía endocítica** opera en dirección opuesta llevando materiales del exterior de la célula (y desde la superficie de la membrana celular) a compartimentos como los endosomas y lisosomas localizados en el interior de la célula (fig. 8-2).

El movimiento de vesículas y de los materiales encerrados en ellas a lo largo de diferentes vías dentro de una célula es análogo a los movimientos de vehículos de carga que llevan diferentes tipos de carga a lo largo de las calles de una ciudad. Ambos tipos de transporte requieren normas definidas de **tráfico** para garantizar que los materiales destinados a diferentes localidades sean entregados con precisión en los sitios apropiados. Por ejemplo, el tráfico de proteínas al interior de una célula de la glándula salival requiere que las proteínas del moco salival, elaboradas en el retículo endoplásmico, se *dirijan* específicamente hacia las vesículas secretorias; en tanto que las enzimas lisosómicas, también elaboradas en el retículo endoplásmico, se envíen

¹ La envoltura nuclear también puede considerarse parte del sistema endomembrana, ya que se continúa con el retículo endoplásmico y es sitio de síntesis de proteínas de membrana. Sin embargo, la envoltura nuclear no es un organelo citoplásmico y su principal papel es regular el flujo de material entre el núcleo y el citoplasma. En consecuencia, su estructura y función se revisan en el capítulo 12.



(a)



(b)

FIGURA 8-2. Las vías biosintética y endocítica unen a las endomembranas en una red dinámica interconectada. *a)* La vía biosintética describe el flujo de materiales (especialmente proteínas) del retículo endoplásmico a través del complejo de Golgi hacia diferentes sitios, incluyendo lisosomas, endosomas, vesículas secretorias, vacuolas y la membrana plasmática. La vía endocítica mueve materiales desde la superficie de la célula al interior de la misma por medio de endosomas y lisosomas, donde en general son desdoblados por las enzimas lisosómicas. La vía endocítica incluye el desplazamiento de proteínas de membrana y materiales extracelulares. Los carbohidratos y los lípidos pueden seguir rutas semejantes, según se describe al final del capítulo. *b)* Diagrama que ilustra el proceso de transporte vesicular mediante el cual los materiales son llevados desde un compartimento donador a un compartimento receptor. Las vesículas se forman por gemación de la membrana, durante la cual las proteínas de la membrana donadora se pueden incorporar a la vesícula membranosa y las proteínas solubles en el compartimento donador pueden quedar encerradas en la luz de la vesícula. Cuando posteriormente la vesícula de transporte se fusiona, las proteínas de la vesícula de la membrana entran a formar parte de la membrana receptora y las proteínas solubles quedan secuestradas en la luz del compartimento receptor.

especialmente a los lisosomas. Las proteínas se dirigen a destinos celulares predeterminados empleando las "direcciones" específicas o *señales seleccionadoras* que llevan las propias proteínas. La *clasificación* de proteínas con diferente dirección se facilita por receptores residentes en las paredes de la vesícula de transporte que reconocen proteínas destinadas a sitios particulares.

En el último decenio se ha avanzado mucho en el mapeo de los patrones de tráfico de células eucariotas al identificar direcciones específicas y receptores que gobiernan el flujo de tráfico y al dilucidar el mecanismo que garantiza la entrega física de los materiales en los sitios apropiados del interior de la célula. En las siguientes páginas se analizarán en detalle estos temas. Primero consideraremos algunos de los más importantes métodos experimentales gracias a los cuales se lograron estos avances.

8-2 Algunas técnicas para el estudio de las citomembranas

Los primeros estudios con microscopía electrónica suministraron a los biólogos una descripción detallada del citoplasma de las células con muy poca atención a las funciones que desempeñaban las estructuras observadas. Para definir las funciones de los organelos citoplásmicos fue necesario desarrollar nuevas técnicas y efectuar experimentos innovadores. Los primeros esfuerzos en este campo fueron recompensados en 1974 con el Premio Nobel para tres biólogos celulares: Christian De Duve, de la University of Louvain, en Bélgica, y Albert Claude y George Palade, de la Rockefeller University. Los métodos experimentales descritos en las siguientes secciones son particularmente útiles para suministrar bases de conocimiento sobre las cuales se basa la investigación actual acerca de membranas citoplásmicas.

Información obtenida por autorradiografía

Entre los cientos de diferentes células del cuerpo, las células acinares del páncreas poseen uno de los sistemas endomem-

brana más desarrollados. Las principales funciones de estas células son sintetizar y secretar enzimas digestivas. Estas enzimas se envían a través de los conductos pancreáticos, donde fueron elaboradas, hacia el intestino delgado, donde desdoblan los alimentos ingeridos. ¿Dónde se sintetizan las proteínas secretorias de las células acinares del páncreas y cómo llegan a la superficie de las células donde serán descargadas? Estas preguntas son intrínsecamente difíciles de responder porque todos los pasos del proceso de secreción normalmente ocurren de manera simultánea dentro de la célula. Para seguir los pasos de un ciclo desde el principio hasta el final, o sea, desde la síntesis de una proteína secretoria hasta su salida de la célula, James Jamieson y George Palade utilizaron la técnica de **autorradiografía**.

Según se analiza con detalle en el capítulo 17, la autorradiografía suministra una manera de visualizar un proceso bioquímico al permitir al investigador ubicar materiales marcados con isótopos radiactivos dentro de una célula. En esta técnica, con una delgada capa de emulsión fotográfica se cubren cortes de tejido que contienen el isótopo radiactivo, que así se expone a la radiación que emana del tejido. Los sitios de las células que contienen radiactividad se manifiestan como granos plateados bajo el microscopio luego de revelar la emulsión que los cubre (fig. 8-3).

Para determinar los sitios donde se sintetizan proteínas secretorias, Palade y Jamieson incubaron durante un breve periodo pedazos de tejido pancreático en solución con aminoácidos radiactivos. En este periodo los aminoácidos marcados fueron captados por las células vivientes e incorporados a las enzimas digestivas conforme se ensamblan en los ribosomas. Los tejidos se fijaron de inmediato, y las proteínas sintetizadas durante la incubación con aminoácidos marcados se determinaron mediante autorradiografía. Esta técnica reveló que el retículo endoplásmico es el sitio donde se sintetizan las proteínas secretorias (fig. 8-3, a).

Para determinar la vía que siguen las proteínas secretorias dentro de la célula desde su sitio de síntesis hasta donde se descargan, Palade y Jamieson efectuaron un nuevo experimento. Después de incubar el tejido por un breve periodo con aminoácidos radiactivos, lo lavaron de inmediato para liberarlo del exceso de isótopos y lo transfirieron a un medio que sólo contenía aminoácidos no marcados. Los experimentos de este tipo se denominan "*de seguimiento de pulsos*". *Pulso* se refiere al breve periodo de incubación con material radiactivo durante el cual se incorporan aminoácidos marcados a la proteína. *Seguimiento* indica el periodo durante el cual se expone el tejido al medio con aminoácidos no marcados, tiempo durante el cual las proteínas se sintetizan utilizando aminoácidos no radiactivos. Cuanto más largo el seguimiento, más lejos viajarán las proteínas elaboradas con isótopos radiactivos durante el pulso a partir del sitio donde se sintetizaron dentro de la célula. En condiciones ideales, con esta técnica se pueden seguir los movimientos de moléculas recién sintetizadas observando la onda de material radiactivo que se desplaza a través del citoplasma de la célula de un sitio al siguiente, en tanto concluye el proceso. Los resultados de estos experimentos, que definieron por primera vez la vía biosintética secretoria y reunieron algunos compartimientos membranosos aparentemente separados en una unidad funcional integrada,

se resumen en la figura 8-3, b-e, y se analizan con amplitud al final del capítulo.

Información obtenida por aislamiento de fracciones subcelulares

La microscopia electrónica y la autorradiografía proporcionan información sobre la estructura y función de los organelos celulares, pero no suministran datos acerca de la composición bioquímica de estas estructuras. Las técnicas para fragmentar (**homogeneizar**) células y aislar tipos particulares de organelos fueron desarrolladas en los decenios de 1950 y 1960 por Albert Claude y Christian De Duve. Cuando se fragmenta una célula por homogeneización, las membranas citoplásmicas se rompen y los extremos de los fragmentos de membrana se fusionan para formar vesículas esféricas menores de 100 nm de diámetro (fig. 8-4, a). Las vesículas derivadas de diferentes organelos membranosos (núcleos, mitocondrias, membrana plasmática, retículo endoplásmico, etc.) tienen diferentes propiedades que permiten separarlas entre sí, método denominado **fraccionamiento celular**.

Entre los diferentes tipos de vesículas membranosas, las del sistema endomembrana (principalmente retículo endoplásmico y complejo de Golgi) forman un grupo heterogéneo de vesículas de tamaño similar conocidas como **microsomas**. En la figura 8-4, a, se muestran los resultados de una purificación rápida (muy burda) de la fracción microsómica de una célula. Dicha fracción microsómica puede fragmentarse todavía más mediante las técnicas estudiadas en la sección 17-6. Por ejemplo, se pueden aislar vesículas derivadas de las diferentes partes del complejo de Golgi o se pueden separar vesículas con cubierta de proteína de las vesículas que carecen de dicha cubierta.

Las vesículas aisladas de la fracción microsómica retienen un notable grado de su actividad original en la célula. Por consiguiente, no sólo se puede determinar su composición bioquímica, sino también muchas de sus capacidades funcionales, como su actividad enzimática o su capacidad para segregar proteína recién sintetizada. Por ejemplo, se observó que las vesículas derivadas de diferentes partes del complejo de Golgi poseen enzimas capaces de añadir diferentes azúcares al extremo de una cadena de carbohidratos en crecimiento de una glucoproteína o de un glucolípido. Una vez aislada determinada enzima se puede utilizar como antígeno para preparar anticuerpos específicos contra dicha enzima. A continuación se pueden unir los anticuerpos a materiales como partículas de oro, visibles con el microscopio electrónico, y comprobar la ubicación de la enzima en el compartimiento membranoso de las células. Estos estudios precisaron el papel del complejo de Golgi en el ensamblado gradual de los carbohidratos complejos.

Información obtenida por estudio de mutantes genéticos

Un mutante es un organismo (o células cultivadas) cuyos cromosomas contienen uno o más genes que codifican pro-

ductos diferentes de los que se encuentran en la mayor parte de los organismos (o células) dentro de la población. Si el producto de un gen mutante no puede efectuar su función normal, la célula con esta mutación muestra una deficiencia característica. Al determinar la naturaleza precisa de la deficiencia se obtiene información acerca de la función del producto del gen normal.

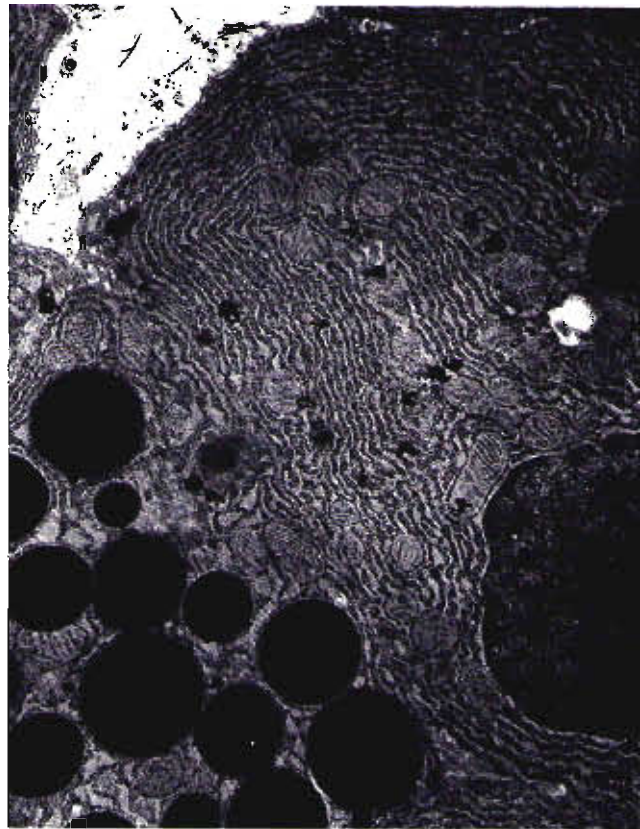
El estudio de las bases genéticas de la secreción se efectuó principalmente en células de levaduras en el laboratorio de Randy Schekman, de la Universidad de California, en Berkeley. Las levaduras son particularmente adecuadas para estudios genéticos, ya que tienen un número relativamente pequeño de genes (en comparación con otros tipos de eucariotes); son organismos unicelulares relativamente pequeños que pueden crecer en cultivo y se desarrollan como células haploides. Una mutación en un solo gen de una célula haploide de levadura produce un efecto observable, puesto que las células carecen de una segunda copia del gen para enmascarar la presencia de un gen anormal. En el transcurso de casi dos decenios, los investigadores aislaron docenas de diferentes mutantes en los cuales prácticamente se han fraccionado todos los pasos de la vía secretoria. Muchos de los genes encargados de estos efectos fueron clonados y las proteínas codificadas, aisladas y secuenciadas. El aislamiento de proteínas de las levaduras motivó investigaciones exitosas de proteínas homólogas en sistemas de mamíferos.

Una de las lecciones más importantes que se aprendieron a partir del empleo de todas estas técnicas es que las actividades dinámicas en las que participan elementos de los sistemas endomembrana son muy persistentes. Células de levaduras, plantas y el cerebro humano no sólo ejecutan procesos similares, sino que también emplean proteínas notablemente semejantes. Es evidente que la diversidad estructural de las células oculta su similaridad molecular subyacente. En muchos casos, proteínas de especies muy divergentes son intercambiables. Por ejemplo, sistemas *in vitro* derivados de células de mamíferos, en condiciones típicas son capaces de utilizar proteínas de levaduras para facilitar el transporte de las vesículas. A la inversa, células de levaduras con deficiencias genéticas que interrumpen alguna fase de la vía biosintética pueden “curarse” en experimentos de ingeniería genética empleando genes de mamíferos.

8-3 Retículo endoplásmico

El **retículo endoplásmico (RE)** se divide en dos categorías muy amplias: **retículo endoplásmico rugoso (RER)** y **retículo endoplásmico liso (REL)** (fig. 8-5). Ambos tipos de RE constituyen un sistema de membranas que encierran un espacio. En consecuencia, el contenido líquido del citoplasma está dividido por el RE en dos compartimientos: un espacio encerrado dentro de sus membranas, denominado **espacio luminal o cisternal**, y la región situada por fuera de las membranas, que es el **espacio citosólico**.

La distinción morfológica entre RER y REL consiste en la presencia de ribosomas unidos en el primero y ausencia de los mismos en el último. Cuando están presentes, los



(a)

FIGURA 8-3. Empleo de la autorradiografía para revelar los sitios de síntesis y el transporte subsecuente de las proteínas secretorias. *a)* Corte de una célula acinar pancreática incubada durante tres minutos con aminoácidos radiactivos, fijada y preparada de inmediato para autorradiografía (véase sección 17-4 para el análisis de esta técnica). Los gránulos plateados que aparecen en la emulsión después de revelada se localizan sobre el retículo endoplásmico. Esta fue la primera indicación clara de que el retículo endoplásmico es el sitio de síntesis de las proteínas secretorias (se estudia con detalle en la página 283). *b-d)* Diagrama de una secuencia de autorradiografías que muestran el movimiento de las proteínas secretorias marcadas (representadas por gránulos plateados en rojo) a través de una célula acinar pancreática. Si la célula es un pulso marcado para tres minutos y fijado de inmediato (como se muestra en *a*), la radiactividad se localiza en el retículo endoplásmico (*b*). Después de un pulso de tres minutos y un seguimiento de 17 minutos, las partículas marcadas se concentran en el complejo de Golgi y vesículas adyacentes (*c*). Luego de un pulso de tres minutos y un seguimiento de 117 minutos, la radiactividad se concentra en los gránulos secretorios y comienza a ser liberada en los conductos pancreáticos (*d*). *e)* Resumen de la cinética de marcado de los diferentes compartimientos de la célula acinar pancreática en el experimento descrito antes. (*a:* Cortesía de James D. Jamieson y George Palade.)

ribosomas siempre se encuentran en la superficie que enfrenta el espacio citosólico. El RER aparece como un organelo membranoso extenso compuesto principalmente de sacos aplanados (*cisternas*) separados por un espacio citosólico como se muestra en la figura 8-6, *a-c*. Las micrografías electrónicas muestran el espacio cisternal del RER dividido en compartimientos separados (p. ej., fig. 8-6, *b*),

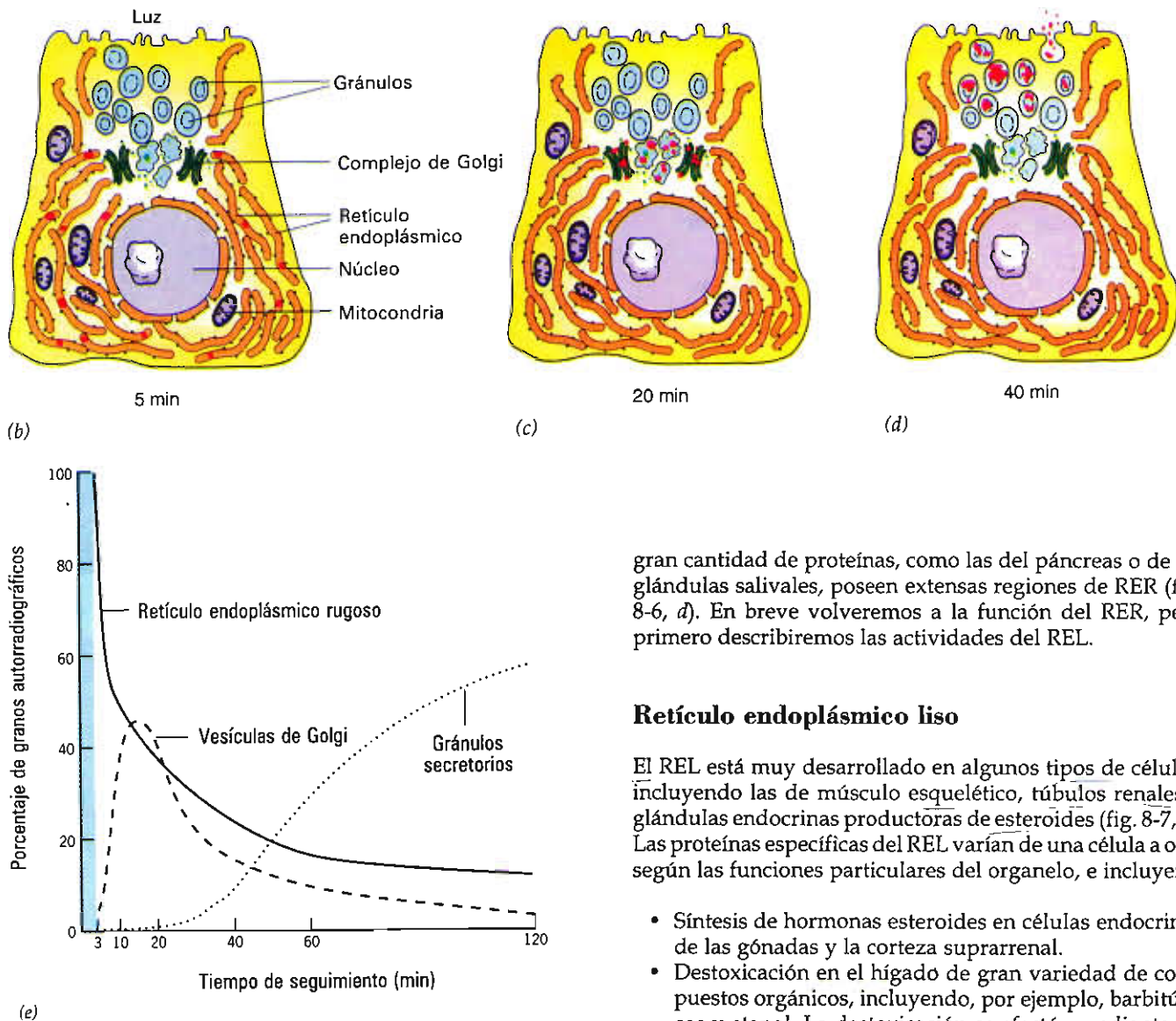


FIGURA 8-3. (Continuación.)

pero se cree que todas las cisternas RER se comunican entre sí y que el espacio cisternal es continuo entre ellas.

Los elementos membranosos del REL son típicamente tubulares (figs. 8-5 y 8-7) y forman un sistema interconectado de tuberías que se incurvan a través del citoplasma en el cual se presentan. Cuando las células son homogeneizadas, los fragmentos REL forman vesículas de superficie lisa, en tanto que las vesículas formadas por fragmentos RER son de superficie rugosa (fig. 8-4, b,c). Los dos tipos de vesículas poseen porosidad diferente y pueden separarse con facilidad; por lo tanto, el contenido de proteínas y lípidos de cada tipo de RE está bien caracterizado.

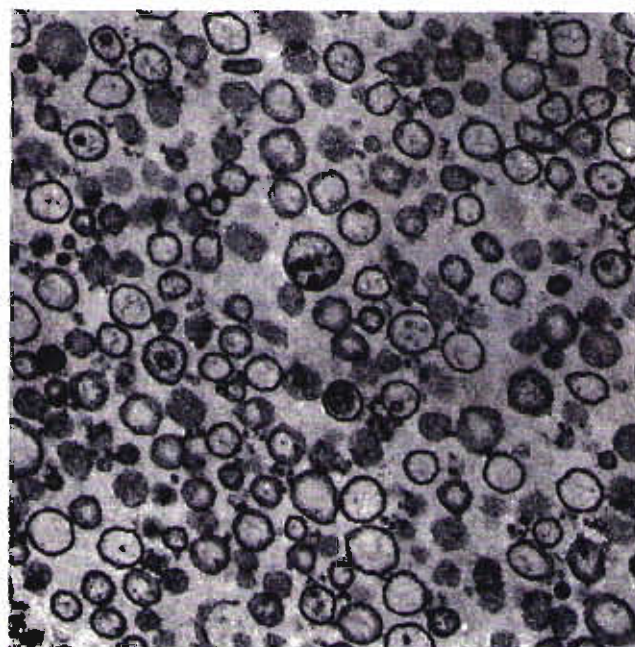
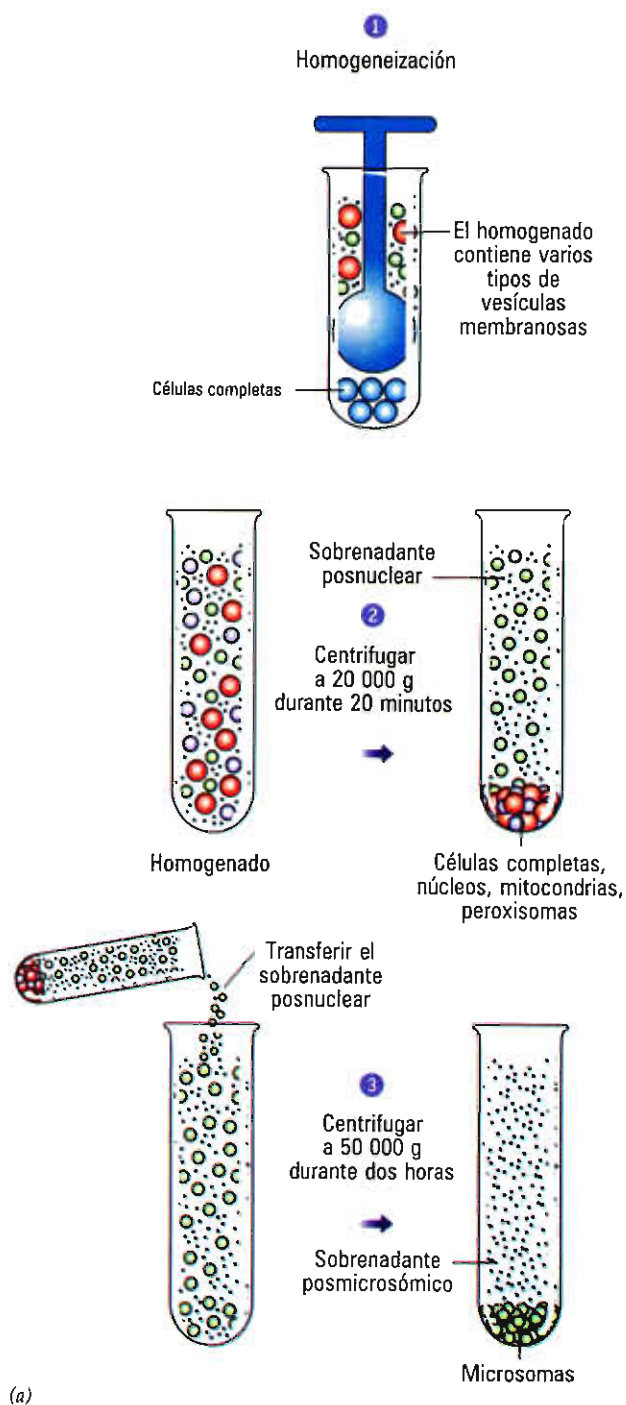
Diferentes tipos de células tienen cantidades notablemente distintas de un tipo de RE o del otro, según las actividades de la célula. Por ejemplo, las células que secretan

gran cantidad de proteínas, como las del páncreas o de las glándulas salivales, poseen extensas regiones de RER (fig. 8-6, d). En breve volveremos a la función del RER, pero primero describiremos las actividades del REL.

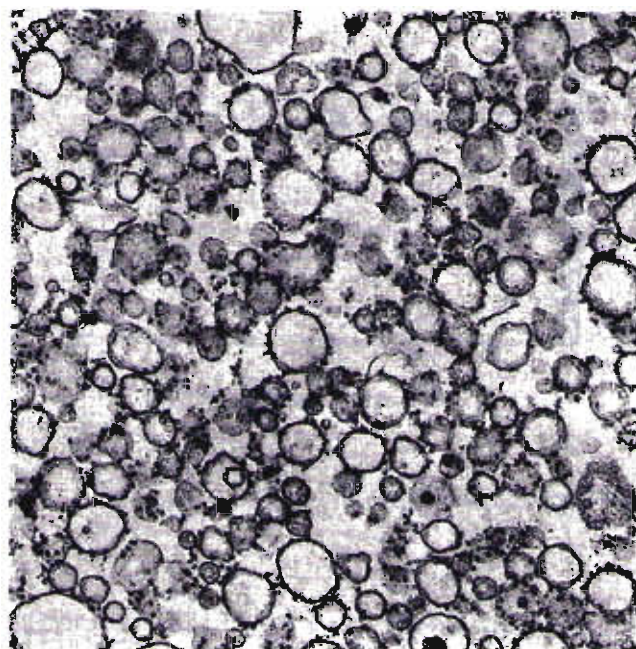
Retículo endoplásmico liso

El REL está muy desarrollado en algunos tipos de células, incluyendo las de músculo esquelético, túbulos renales y glándulas endocrinas productoras de esteroides (fig. 8-7, a). Las proteínas específicas del REL varían de una célula a otra según las funciones particulares del organelo, e incluyen:

- Síntesis de hormonas esteroides en células endocrinas de las gónadas y la corteza suprarrenal.
- Destoxicación en el hígado de gran variedad de compuestos orgánicos, incluyendo, por ejemplo, barbitúricos y etanol. La destoxicación se efectúa mediante un sistema de enzimas que transfieren oxígeno (oxigenasas), entre las cuales se incluye el citocromo P450. Es digno de mencionar que dada su falta de especificidad para sustrato, estas enzimas tienen capacidad de oxidar miles de diferentes compuestos hidrófobos y convertirlos en sustancias más hidrófilas y más fáciles de excretar. Los efectos no siempre son positivos; el compuesto benzo[a]pireno relativamente poco nocivo (formado al tostar carne sobre una parrilla) se convierte en un potente carcinógeno por acción de las enzimas "destoxicantes" del REL.
- Liberación de glucosa a partir de la glucosa 6-fosfato en células hepáticas mediante la enzima glucosa 6-fosfatasa. Grandes reservas de glucógeno se encuentran almacenadas en el hígado en forma de gránulos unidos a la superficie externa de las membranas del retículo endoplásmico liso (fig. 8-7, b). Cuando se requiere energía química, el glucógeno se desdobla por acción de la enzima fosforilasa y forma glucosa 1-fosfato, que a continuación se convierte en glucosa 6-fosfato en el citoplas-



(b)



(c)

0.3 μm

FIGURA 8-4. Aislamiento de una fracción microsómica por centrifugación diferencial. a) Cuando se fragmenta una célula por homogeneización mecánica (paso 1), los diferentes organelos membranosos se rompen y forman vesículas membranosas esféricas. Las vesículas derivadas de diferentes organelos pueden separarse por distintas técnicas de centrifugación. En el procedimiento que aquí se muestra, el homogeneizado celular primero se sometió a centrifugación a baja velocidad para formar esferas de las partículas más densas y de mayor tamaño, dejando las vesículas más pequeñas (microsomas) en el sobrenadante (paso 2). Los microsomas se pueden quitar del sobrenadante por centrifugación a mayor velocidad durante periodos más prolongados (paso 3). Una fracción microsómica cruda de este tipo se puede fraccionar en diferentes tipos de vesículas en pasos subsecuentes. b) Micrografía electrónica de una fracción microsómica lisa en la cual las vesículas membranosas carecen de ribosomas. c) Micrografía electrónica de una fracción microsómica rugosa que contiene membranas tachonadas de ribosomas. (b-c: cortesía de J.A. Higgins y R.J. Barnett.)

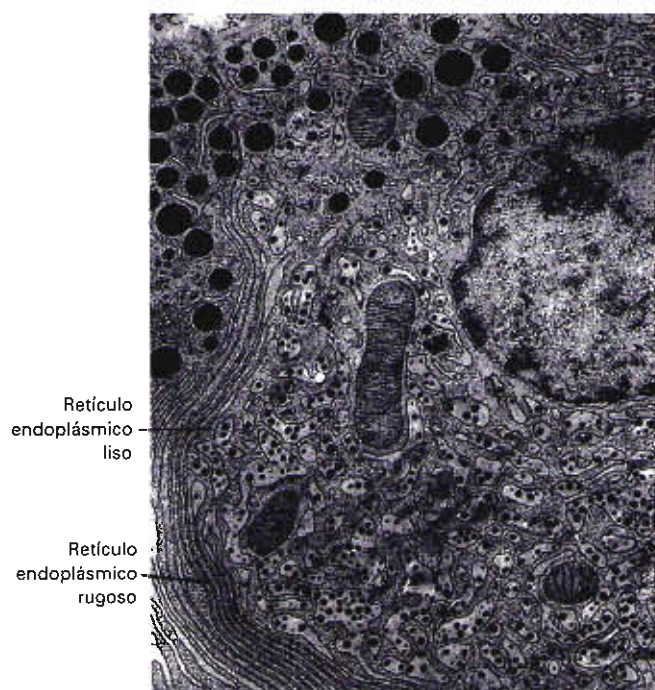


FIGURA 8-5. Retículo endoplásmico. Micrografía electrónica de una parte de la célula pancreática de murciélago que muestra el retículo endoplásmico liso y rugoso. (Cortesía de Keith R. Porter.)

ma. En tanto el azúcar permanezca en estado fosforilado, no puede dejar la célula hepática; la membrana plasmática es impermeable a los azúcares fosfato. La glucosa 6-fosfatasa de las membranas REL elimina el grupo fosfato y genera moléculas de glucosa que finalmente se desplazan hacia la corriente sanguínea, donde se transportan a los tejidos del cuerpo.

- Secuestro de iones calcio dentro del espacio cisternal. La liberación regulada de Ca^{2+} de las membranas REL desencadena respuestas celulares específicas, incluyendo contracción de células musculares esqueléticas (fig. 9-63).

Retículo endoplásmico rugoso

Las primeras investigaciones acerca de la función del RER se efectuaron en células que secretan gran cantidad de proteínas, como las células acinares del páncreas (fig. 8-3) o las células secretoras de moco del revestimiento del conducto digestivo (fig. 8-8). A partir del esquema y la micrografía de la figura 8-8 es evidente que los organelos internos de estas células tienen marcada polaridad sobre el eje longitudinal de la célula, o sea, de su extremo basal al apical. El núcleo y la extensa región de cisternas RER se localizan cerca de la superficie basal de la célula que se enfrenta al riego sanguíneo. El complejo de Golgi se localiza en la región central de la célula. El extremo apical de la misma, que se enfrenta a la luz del conducto, contiene materiales secretorios envueltos en membranas cuyo contenido se libera con facilidad en el

conducto cuando llega la señal apropiada. La polaridad de los organelos de estas células epiteliales glandulares refleja el flujo de productos secretorios a través de la célula desde su sitio de síntesis hasta el de descarga.

Síntesis de proteínas en ribosomas enlazados por membranas en comparación con ribosomas "libres"

El papel del retículo endoplásmico rugoso como sitio de síntesis de las proteínas secretoras en el páncreas fue demostrado por Jamieson y Palade, según se describió antes (pág. 280). Se han observado resultados similares en otros tipos de células secretoras, incluyendo las células caliciformes del intestino que secretan mucoproteínas, células endocrinas que secretan hormonas polipeptídicas, células plasmáticas que secretan anticuerpos y células hepáticas que secretan proteínas séricas.

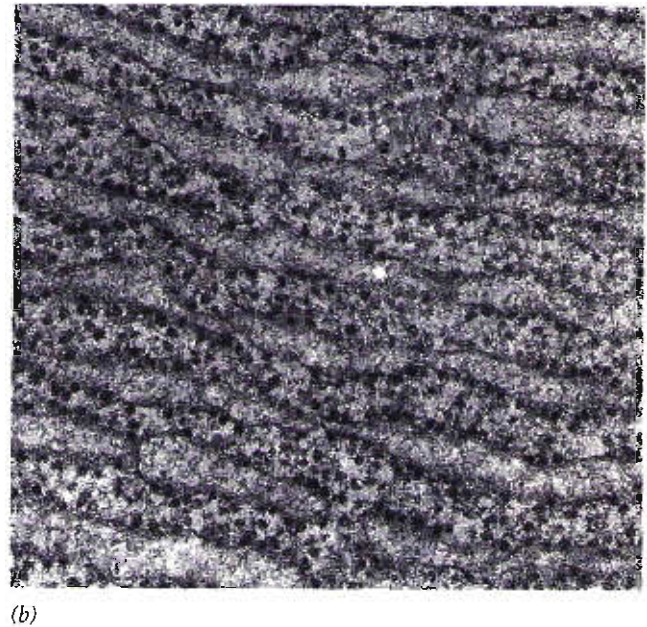
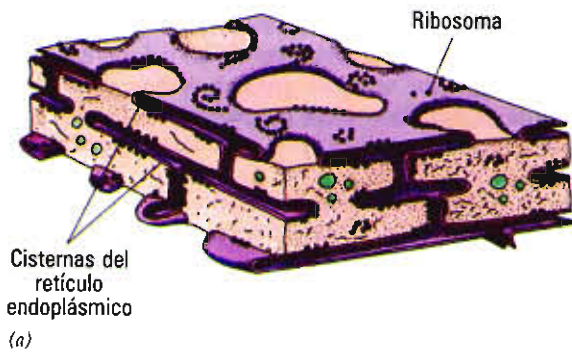
Nuevos experimentos han revelado que las proteínas se pueden dividir en dos clases, según el sitio donde se ensamblan en la célula.

1. Un tipo de polipéptido se ensambla en los ribosomas unidos a la superficie externa (citoplásmica) de las membranas RER. Este tipo incluye: a) proteínas secretadas por la célula; b) proteínas integrales de membrana, y c) proteínas de ciertos organelos, incluyendo complejo de Golgi, lisosomas, endosomas y vacuolas de plantas.
2. El otro tipo de proteínas se ensambla en ribosomas "libres" y posteriormente se libera en el citoplasma. Este tipo incluye: a) proteínas destinadas a permanecer en el citoplasma (como las enzimas glucolíticas o las proteínas del citoesqueleto); b) proteínas periféricas de la superficie interna de la membrana plasmática (como espectrinas y anquirinas, que sólo se unen débilmente a la superficie de la membrana), y c) proteínas que normalmente se encuentran en corpúsculos microscópicos, cloroplastos y mitocondrias. Este último grupo de proteínas se sintetizan en el citoplasma y luego se importan totalmente formadas (es decir, después de traducción) a través de la membrana al interior del organelo apropiado.

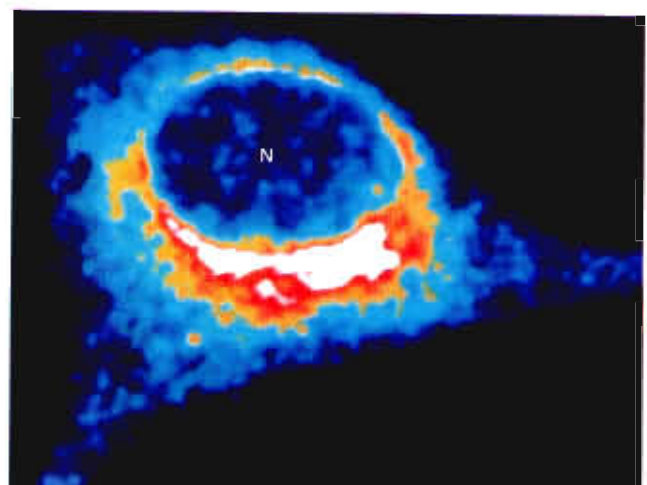
¿Cómo pueden identificar las células estos dos tipos de proteína y delimitar sus sitios de síntesis? En 1971, Gunter Blobel y David Sabatini, de la Rockefeller University, propusieron que la síntesis de una proteína en un ribosoma rodeado de membrana o en un ribosoma libre depende de la información contenida en la porción N terminal del polipéptido, que es la primera parte que surge del ribosoma durante la síntesis de proteína. Sugirieron que las proteínas secretoras contienen una **secuencia de señales** especial en el N terminal que provoca la unión del ribosoma con una membrana del RE y el desplazamiento del polipéptido naciente al interior del espacio cisternal del RE. Esta hipótesis, conocida como **hipótesis de la señal**, ha sido apoyada por numerosas pruebas experimentales.

Síntesis de una proteína secretoria o lisosómica en ribosomas enlazados a membrana

Las etapas que ocurren durante la síntesis de una proteína secretoria o lisosómica se muestran en la figura 8-9. La sín-



(c) 0.3 μm



(d) 5 μm

FIGURA 8-6. Retículo endoplásmico rugoso (RER). *a)* Diagrama que muestra las pilas de cisternas aplanadas que constituyen el retículo endoplásmico rugoso. La superficie citosólica de la membrana contiene ribosomas enlazados, que confieren a la cisterna su aspecto rugoso. *b)* Micrografía electrónica por transmisión de una porción del RER de una célula acinar pancreática. Es evidente la división del RER en espacio cisternal (desprovisto de ribosomas) y espacio citoplásmico. *c)* Gammaografía electrónica del RER en una célula acinar pancreática. *d)* Visualización del RE mediante gammaografía confocal en una célula total cultivada. El RE (colores naranja y blanco) se concentra en la región que rodea el núcleo (N). (*b*: Cortesía de S. Ito; *c*: según K. Tanaka, *Int. Rev. Cytol.* 68:101, 1980; *d*: según Ayyappan K. Rajasekaran y cols. *J. Cell Biol.* 105:342, 1993; con permiso de The Company of Biologists Ltd.)

tesis del polipéptido se inicia luego que un RNA mensajero se enlaza a un ribosoma libre, o sea, *no* unido a la membrana citoplásmica. En realidad, los ribosomas empleados para sintetizar proteínas integrales de membrana, secretorias o lisosómicas provienen de la misma población (*reserva*) que los utilizados para producir proteínas que permanecen en el citoplasma. Según predijeron Blobel y Sabatini, los polipéptidos ensamblados en ribosomas enlazados a la membrana contienen una secuencia de señales, que incluye un

tramo de seis a 20 aminoácidos no polares, que orienta el polipéptido *naciente* hacia la membrana del RE y conduce a la compartimentalización del polipéptido en la luz del retículo endoplásmico. (Un polipéptido *naciente* es el que se halla en proceso de síntesis y por lo tanto no está todavía completamente ensamblado.) Aunque el péptido de señal de ordinario se localiza en el N terminal o cerca del mismo, puede ocupar una posición interna en alguno de los polipéptidos.

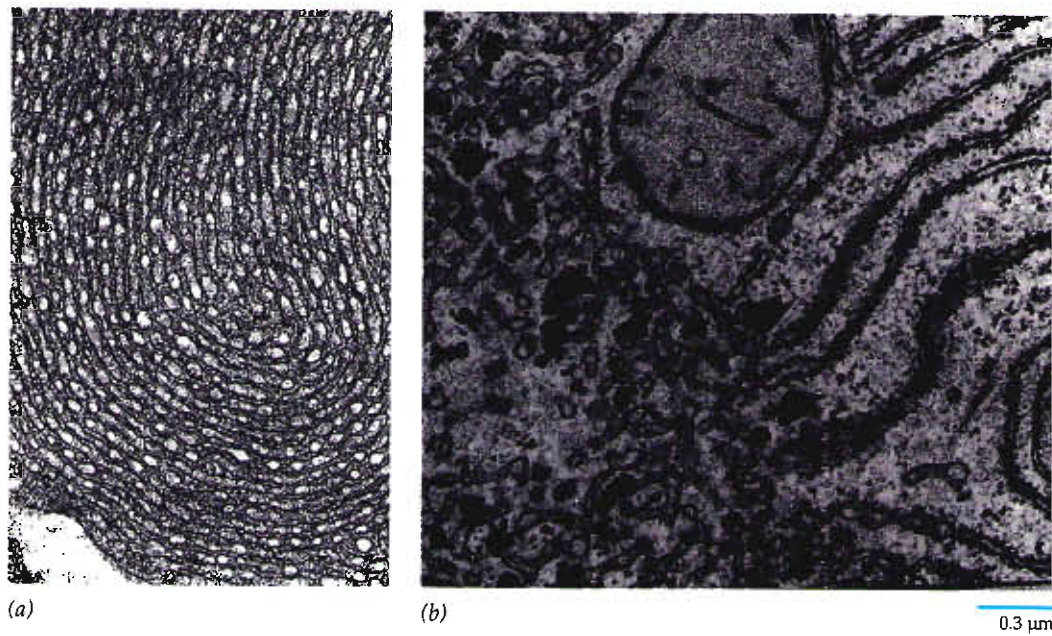


FIGURA 8-7. Retículo endoplásmico liso (REL). *a)* Micrografía electrónica de una célula de Leydig de los testículos que muestra el RE liso extenso donde se sintetizan hormonas esteroideas. *b)* Micrografía electrónica de una célula hepática de rata mostrando la continuidad entre las membranas del RE rugoso y del liso (flechas grandes), y también la estrecha relación de los gránulos de glucógeno con el RE liso. (*a:* Según Don W. Fawcett; *b:* según Albert L. Jones y Douglas L. Schmucker, *Gastroenterology* 73:847, 1977.)

Conforme surge del ribosoma, la secuencia de señales será reconocida por una **partícula para reconocimiento de señales (PRS)**, que consta de seis polipéptidos distintos y una pequeña molécula de RNA denominada RNA 7SL. La PRS se enlaza a la secuencia de señales (paso 1, fig. 8-9) y detiene la síntesis del polipéptido, evitando que el N terminal sufra plegamiento anormal prematuro. El cese de la traducción después del enlace de la PRS da tiempo al complejo para encontrar una membrana RE a la cual pueda unirse, de otro modo el polipéptido podría ser sintetizado en el citoplasma.

La PRS enlazada actúa como “etiqueta”, que permite a todo el complejo (PRS-ribosoma-polipéptido nascente) enlazarse a un **receptor de PRS** localizado en la superficie citoplásmica de la membrana del retículo endoplásmico (paso 2, fig. 8-9). Se cree que la fijación del complejo ribosoma-PRS a la membrana del RE conduce a la liberación de la PRS de la secuencia de señales; al enlace de la secuencia de señales a un componente de la membrana del RE (paso 3, fig. 8-9), el cual prepara el polipéptido nascente para penetrar a la membrana; a la liberación de la PRS del receptor de la PRS dentro del citoplasma; al desplazamiento (**translocación**) del polipéptido nascente a través del canal revestido de proteína que atraviesa la membrana (paso 4), y finalmente a la liberación del ribosoma enlazado a la membrana.

La liberación de la PRS de la secuencia de señales requiere el enlace de GTP a la proteína enlazada a GTP, en tanto que la liberación de la PRS del receptor de la PRS, que permite el inicio de la translocación, requiere la hidrólisis del GTP enlazado. Como estudiaremos en detalle en el capítulo 15, las proteínas enlazadas a GTP (o proteínas G)

desempeñan un papel regulador clave en muchos procesos celulares. Debido a que existen en dos conformaciones alternas, una forma enlazada a GTP y otra enlazada a GDP, las proteínas G pueden actuar como interruptores moleculares que inician o detienen procesos específicos. En el presente ejemplo, el enlace a GTP y la hidrólisis garantizan que el ribosoma participe de manera apropiada en el mecanismo de la membrana para translocación antes de continuar la síntesis del polipéptido.

En la actualidad se puede estudiar *in vitro* todo el proceso de síntesis de proteína enlazada a la membrana empleando vesículas artificiales o vesículas celulares aisladas en diferentes combinaciones de proteínas purificadas. Por ejemplo, recientemente se confirmó la existencia de un canal revestido de proteína en la membrana del RER, sospechado durante largo tiempo, mediante experimentos electrofisiológicos efectuados en vesículas aisladas del RER que sintetizan proteínas. Estos experimentos revelan la presencia de canales de conductividad elevada a iones que sirven como vías de paso para polipéptidos en proceso de translocación. La abertura de estos canales depende de los ribosomas enlazados; cuando se libera el ribosoma, la compuerta del canal se cierra.

Conforme el polipéptido nascente penetra en la cisterna del RER, es conducido por diferentes enzimas localizadas en la membrana o en la luz del RER. El polipéptido nascente elimina la porción N terminal que contiene el péptido de señal mediante una enzima proteolítica, la **peptidasa de señal**. Una oligosacariltransferasa, otra proteína integral de membrana del RER (estudiada más adelante), añade carbohidratos a la proteína nascente.

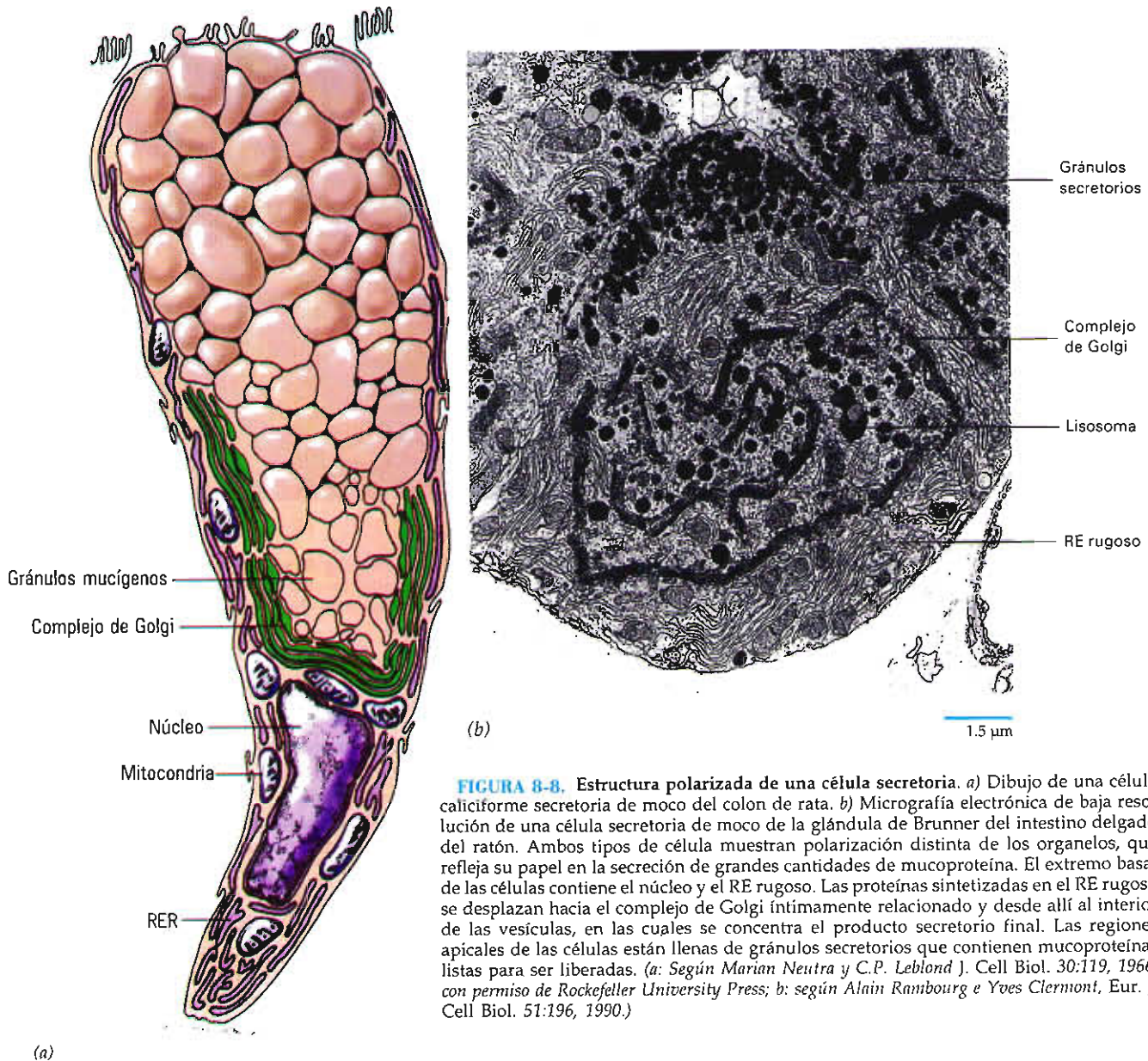


FIGURA 8-8. Estructura polarizada de una célula secretoria. *a)* Dibujo de una célula caliciforme secretoria de moco del colon de rata. *b)* Micrografía electrónica de baja resolución de una célula secretoria de moco de la glándula de Brunner del intestino delgado del ratón. Ambos tipos de célula muestran polarización distinta de los organelos, que refleja su papel en la secreción de grandes cantidades de mucoproteína. El extremo basal de las células contiene el núcleo y el RE rugoso. Las proteínas sintetizadas en el RE rugoso se desplazan hacia el complejo de Golgi íntimamente relacionado y desde allí al interior de las vesículas, en las cuales se concentra el producto secretorio final. Las regiones apicales de las células están llenas de gránulos secretorios que contienen mucoproteínas listas para ser liberadas. (*a:* Según Marian Neutra y C.P. Leblond J. Cell Biol. 30:119, 1966, con permiso de Rockefeller University Press; *b:* según Alain Rambourg e Yves Clermont, Eur. J. Cell Biol. 51:196, 1990.)

La luz del RER contiene una elevada concentración de proteínas cuyo papel es garantizar que las proteínas recién sintetizadas sufran las reacciones apropiadas de plegamiento para alcanzar su estructura funcional terciaria y cuaternaria. En estas proteínas se incluye la enzima *proteindisulfuro isomerasa* que cataliza la formación y reordenamiento de enlaces disulfuro entre residuos de cisteína de la cadena del polipéptido, así como con numerosos chaperones moleculares (pág. 72) que evitan la formación de agregados o plegamientos erróneos de polipéptidos. De alguna manera, la célula reconoce las proteínas plegadas o ensambladas de manera incorrecta y las retiene en el RE, donde pueden ser destruidas. Este proceso, conocido como *control de calidad*, ayuda a garantizar que las proteínas anormales no se transporten a otras partes de la célula. Un ejemplo de este proce-

so se observa en algunos casos graves de fibrosis quística, donde la proteína mutante RTFQ no puede llegar a la superficie de la célula (pág. 153).

La estructura del retículo endoplásmico es ideal para cumplir su papel como sitio de entrada a la vía biosintética de la célula. Su membrana proporciona una gran superficie sobre la cual se pueden fijar muchos ribosomas (unos 13 millones por cada célula viviente). La luz del RE proporciona un ambiente local que favorece plegamiento y ensamblado correctos de las proteínas y un compartimiento donde pueden separarse proteínas secretorias, lisosómicas y vacuolares de otras proteínas recién sintetizadas. Como se mencionó antes, las células deben tener capacidad para determinar dónde debe residir una proteína recién sintetizada, sea fuera de la célula, en uno de los organelos membranosos del

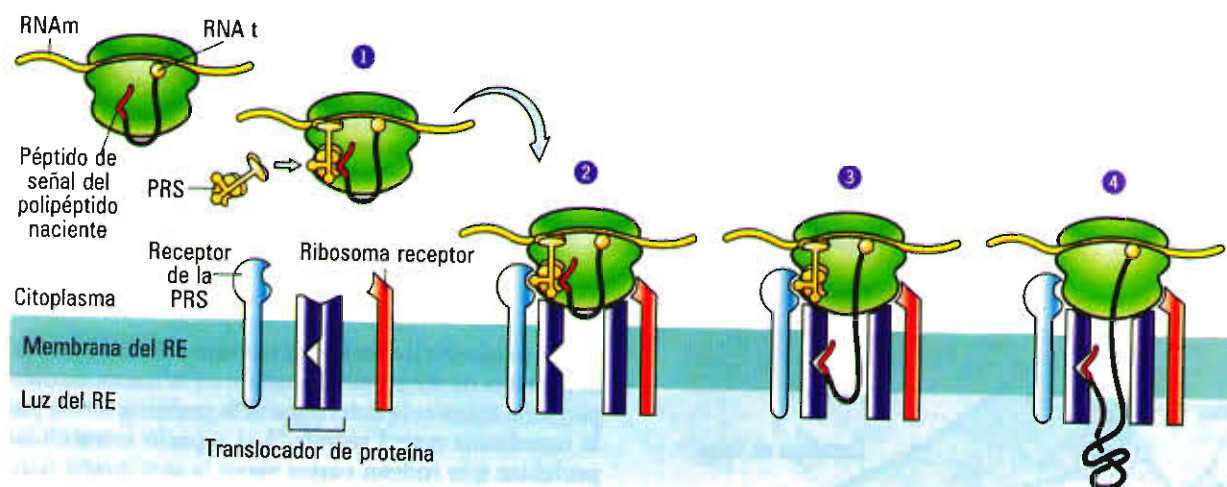


FIGURA 8-9. Modelo para la síntesis de proteínas secretorias (o una enzima lisosómica) en un ribosoma enlazado a la membrana del RE rugoso. La síntesis del polipéptido se inicia en un ribosoma libre. Conforme la secuencia señal (mostrada en rojo) emerge del ribosoma, se enlaza a la partícula para reconocimiento de señales (1), que detiene la traducción en tanto se pone en contacto con la membrana del RE rugoso. La fijación del ribosoma a la membrana del retículo endoplásmico (2) es mediada por un receptor para la partícula para reconocimiento de señales y un receptor separado del ribosoma. En los pasos subsiguientes (3 y 4), la PRS se libera del péptido de señal y luego del receptor de la PRS (pasos que requieren GTP y proteína enlazada a GTP), el péptido de señal se une a un componente de la membrana RE (indicada aquí donde se une a la superficie interna del conducto) y el resto del polipéptido se transloca a través del conducto. Luego que el polipéptido naciente pasa al interior de la luz del RE, una proteína de membrana (la peptidasa de señal) separa la señal del péptido. Una vez en la luz, el polipéptido interactúa con las proteínas que garantizan un plegamiento apropiado (pág. 73) y promueven la formación de enlaces disulfuro.

citoplasma o dentro del citoplasma. El asilamiento de proteínas recién sintetizadas en las cisternas del RE prácticamente las elimina del citoplasma y permite enviarlas a su destino final. Este proceso es un claro ejemplo del papel de las membranas en la compartimentalización del espacio dentro de la célula de modo que puedan separarse los diferentes tipos de actividades.

Biosíntesis de membranas en el retículo endoplásmico

Las membranas no se originan *de novo*, o sea, entidades nuevas procedentes de las reservas de proteínas y lípidos; más bien, sólo se originan a partir de membranas preexistentes. Las proteínas y lípidos recién sintetizados se introducen continuamente a las membranas ya existentes, proceso que en su mayor parte ocurre en el retículo endoplásmico. Como veremos a continuación, los elementos de la membrana se desplazan del RE a casi todos los otros compartimientos de la célula. Conforme la membrana se desplaza a través de la célula, las enzimas que residen en los diferentes compartimientos de la célula modifican su composición de diferente manera. Por lo tanto, aunque la membrana puede fluir por medio de vesículas desde el RE a través del complejo de Golgi hacia la membrana plasmática, las membranas que constituyen cada uno de estos compartimientos tienen su propia composición única y mantienen su identidad propia distintiva (cuadro 4-1).

Recordemos que las membranas celulares son asimétricas; las dos superficies de una membrana tienen una estructura muy diferente (pág. 125). Esta asimetría se establece inicialmente en el retículo endoplásmico conforme lípidos y proteínas se incorporan a la bicapa, y se mantiene a medida que la membrana pasa por los procesos de gemación y fu-

sión de un compartimiento al siguiente. Como resultado, los componentes situados en la superficie cisternal de la membrana del RE se pueden identificar en la superficie luminal de las vesículas de transporte, la superficie luminal de la cisterna de Golgi y la superficie externa (exoplásmica) de la membrana plasmática (fig. 8-10).

Síntesis de proteínas integrales de membrana en los ribosomas enlazados a la misma. Las proteínas integrales de membrana, como glucoforina y banda 3 de la membrana plasmática del eritrocito (fig. 4-31) se ensamblan de manera muy similar a las proteínas secretorias y lisosómicas ya estudiadas. Se sintetizan en los ribosomas enlazados a la membrana y se translocan a través de la membrana del RE conforme el polipéptido se alarga. A diferencia de las proteínas secretorias y lisosómicas, que atraviesan por completo la membrana, las proteínas integrales contienen uno o más tramos de aminoácidos hidrófobos que sirven como *secuencia para detener la transferencia*, las cuales impiden movimientos adicionales de la proteína dentro de la cámara cisternal. Se ha postulado que la translocación de la secuencia que detiene la transferencia en la proteína que reviste el canal abre lateralmente dicho canal y permite que la parte hidrófoba del polipéptido naciente penetre a la bicapa de lípidos. La figura 8-11 muestra la síntesis del tipo más sencillo de proteína integral, la que sólo contiene un segmento transmembrana, cuyo N terminal se localiza en el lado cisternal de la membrana del RE y cuyo C terminal se encuentra en el lado citoplásmico.

Hay numerosos ejemplos en que la "misma" proteína aparece en dos versiones (isoformas), una soluble y la otra enlazada a la membrana. Estas proteínas tienen la misma secuencia de señales y la misma secuencia primaria, excepto

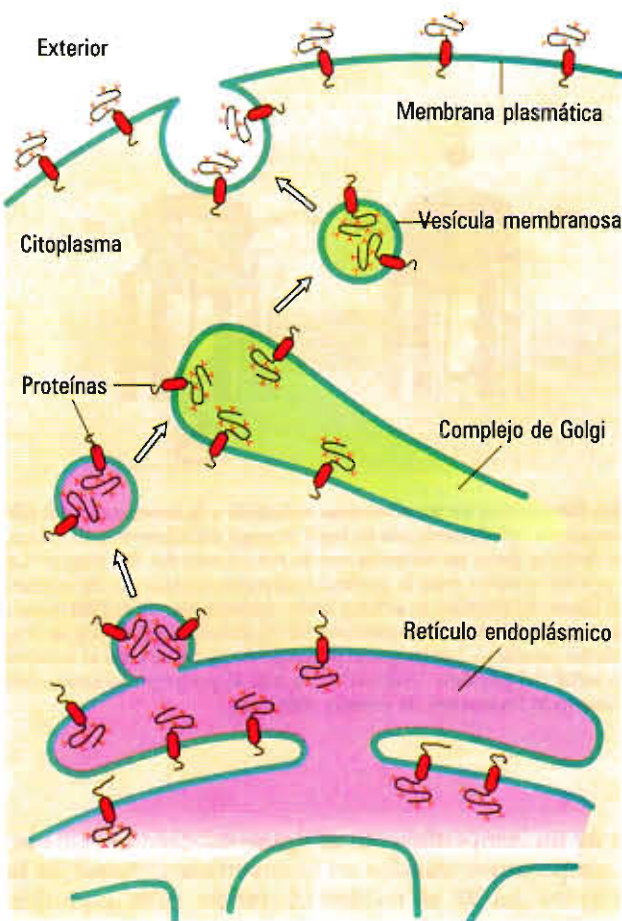


FIGURA 8-10. Mantenimiento de la asimetría de la membrana. A medida que las proteínas se sintetizan en el RE rugoso, entran a la bicapa de lípidos en una orientación predecible determinada por su secuencia de aminoácidos. Esta orientación persiste por todo el trayecto del sistema endomembrana, según se ilustra en la figura. Las cadenas de carbohidratos se añaden primero al RE y constituyen una manera conveniente de evaluar la lateralidad de la membrana, ya que siempre aparecen sobre el lado cisternal de las membranas citoplásmicas, que se transforman en el lado exoplásmico de la membrana plasmática luego que se fusionan de vesículas con dicha membrana (paso mostrado en la figura 8-27).

por la presencia de un tramo transmembrana hidrófobo en la proteína de membrana, ausente en la forma soluble. Esta pequeña diferencia determina si la proteína forma parte de la membrana o será secretada al espacio extracelular. Las proteínas que rodean varias veces la membrana tienen un número de tramos hidrófobos que corresponden a los dominios transmembrana respectivos (como en la figura 4-16).

Síntesis de lípidos de membrana. Casi todos los lípidos de la membrana se sintetizan en el retículo endoplásmico; las principales excepciones son esfingomielina y glucolípidos, cuya síntesis comienza en el RE y concluye en el complejo de Golgi. Las enzimas implicadas en la síntesis de fosfolípidos son proteínas integrales de membrana del RE con sus sitios activos enfrentando al citoplasma. Los fosfolípidos recién sintetizados se introducen en la mitad de la bicapa que enfrenta al citoplasma. Algunas de estas moléculas lipídicas se desplazan más tarde hacia la hoja opuesta ayudadas por proteínas (flipasas) que translocan activamente las moléculas de los lípidos a través de la bicapa.

El hecho de que las membranas de diferentes organelos posean composición lipídica notablemente diferente (cuadro 4-2) indica que los cambios tienen lugar conforme la mem-

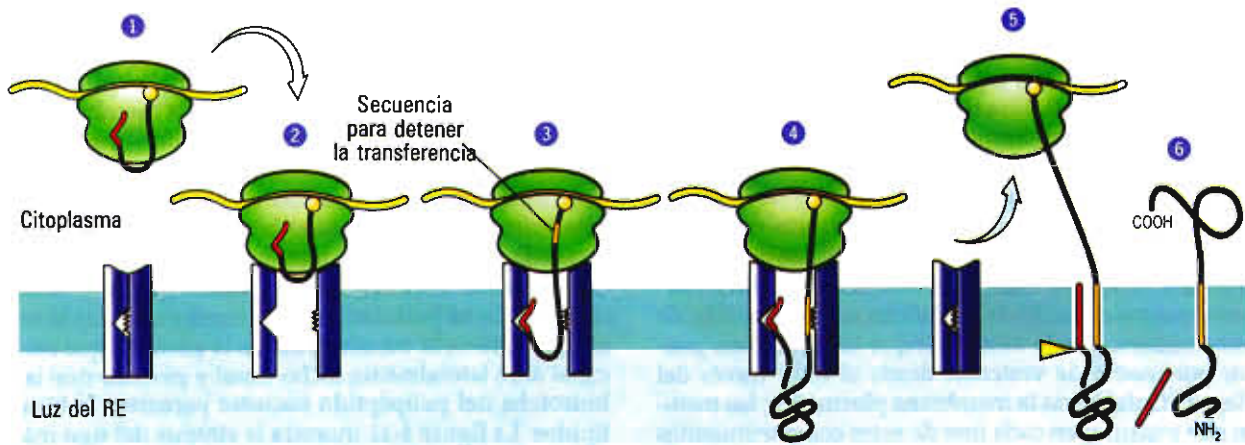
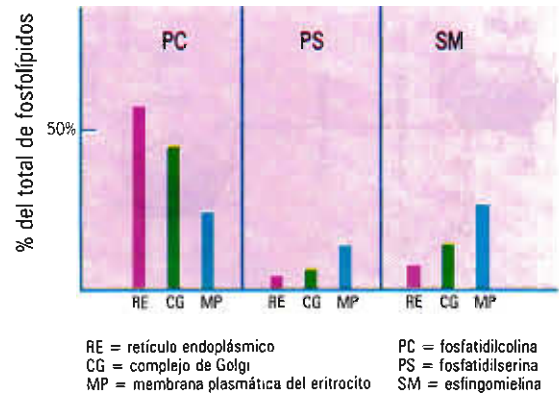


FIGURA 8-11. Modelo de la síntesis de una proteína integral de membrana que contiene un solo segmento transmembrana y una secuencia de señales cerca del N terminal del polipéptido naciente. La PRS y los diferentes componentes de la membrana mostrados en la figura 8-9 también participan en la síntesis de proteínas integrales, pero se omiten para mayor sencillez. El polipéptido naciente se transloca al canal revestido de proteína, igual que si fuera una proteína secretoria (1-3), pero la entrada de la secuencia que detiene la transferencia hidrofóbica al interior del poro (4) abre el canal lateralmente y la hélice hidrofóbica se introduce en la bicapa (5-6). Se asume que en este momento el ribosoma se libera de la membrana y la síntesis de la porción restante del polipéptido (la porción C terminal) ocurre conforme el ribosoma se libera en el citoplasma (como en el paso 5). Los polipéptidos que tienen más de un segmento transmembrana poseen una secuencia hidrofóbica adicional que ayuda a introducirlos en la bicapa.

FIGURA 8-12. Modificación de la composición de los lípidos de la membrana. a) Histograma que indica el porcentaje de cada uno de los tres fosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidilserina y esfingomielina) en tres diferentes tipos de membrana celular (retículo endoplásmico, complejo de Golgi y membrana plasmática). El porcentaje de cada especie de lípido aparentemente cambia de manera gradual conforme la membrana fluye desde el RE a las membranas de Golgi y plasmática. b) Diagrama que muestra tres mecanismos distintos para explicar cómo puede ser diferente la composición de fosfolípidos de una membrana del sistema endomembrana en comparación con otra membrana del sistema, aunque los compartimientos de membrana sean continuos espacial y temporalmente. 1) En la cabeza de los fosfolípidos de la bicapa, los grupos se modifican enzimáticamente; 2) la membrana de una vesícula en formación tiene fosfolípidos de composición diferente a los de la membrana a partir de la cual se forma por gemación; 3) los fosfolípidos se pueden eliminar físicamente de una membrana e introducir a otra membrana mediante intercambio de proteínas por fosfolípidos.



(a)

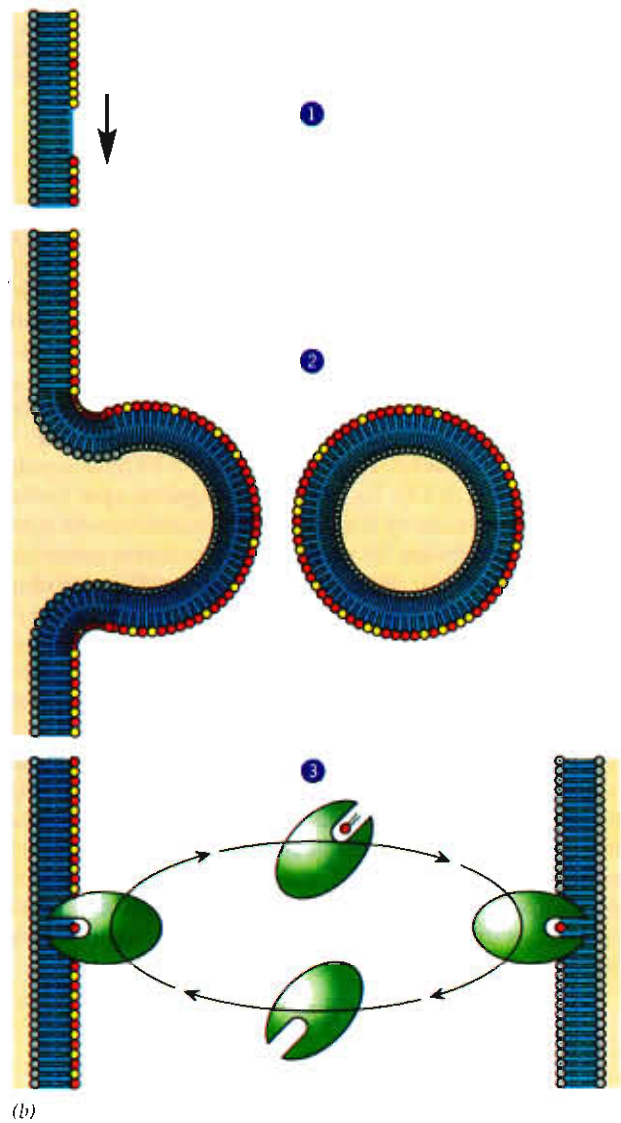
brana fluye a través de la célula. Hay varios factores que contribuyen a dichos cambios (fig. 8-12).

1. La mayor parte de los organelos poseen la capacidad de modificar los lípidos ya presentes en una membrana, convirtiendo un tipo de fosfolípido (como la fosfatidilserina) en otro (p. ej., fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina).
2. Cuando las vesículas se forman por gemación de un compartimiento (como en la figura 8-2, b), algunos tipos de fosfolípidos pueden ser incluidos de manera preferencial en la membrana de la vesícula en formación, en tanto que otros tipos no se incluyen.
3. Las células contienen **proteínas para intercambiar con fosfolípidos** cuya función es transportar fosfolípidos específicos a través del citoplasma acuoso de un tipo de compartimiento de membrana a otro. Estas enzimas pueden facilitar el desplazamiento de fosfolípidos específicos desde el RE a otros organelos, incluyendo mitocondrias y cloroplastos.

Glucosilación en el retículo endoplásmico rugoso

Casi todas las proteínas producidas en ribosomas enlazados a la membrana, ya sean componentes integrales de membrana, enzimas lisosómicas o vacuolares, o partes de la matriz extracelular, se convierten en glucoproteínas. Como se indicó en la figura 4-12, b, las cadenas de carbohidratos pueden fijarse a una proteína mediante uniones *N* (al átomo de nitrógeno de un residuo asparagina) o uniones *O* (al átomo de oxígeno de un residuo serina o treonina [o un residuo hidroxicolina en la colágena]). Hay diferencias en las dimensiones promedio, composición del azúcar y vía de síntesis entre estos dos tipos de oligosacáridos, pero comparten ciertas propiedades. De mayor importancia es que las secuencias de azúcares que componen ambos tipos de oligosacáridos son altamente específicas; si se aíslan los oligosacáridos de una proteína purificada, las secuencias son consistentes y predecibles. ¿Cómo se determina la secuencia de azúcares?

Las macromoléculas más conocidas que poseen una secuencia ordenada de bloques de construcción son los ácidos nucleicos y las proteínas. La secuencia de ácidos nu-



(b)

cleicos y proteínas se genera por medio de una plantilla, o sea, una molécula preexistente que contiene la secuencia. En las glucoproteínas, la secuencia de carbohidratos se ge-

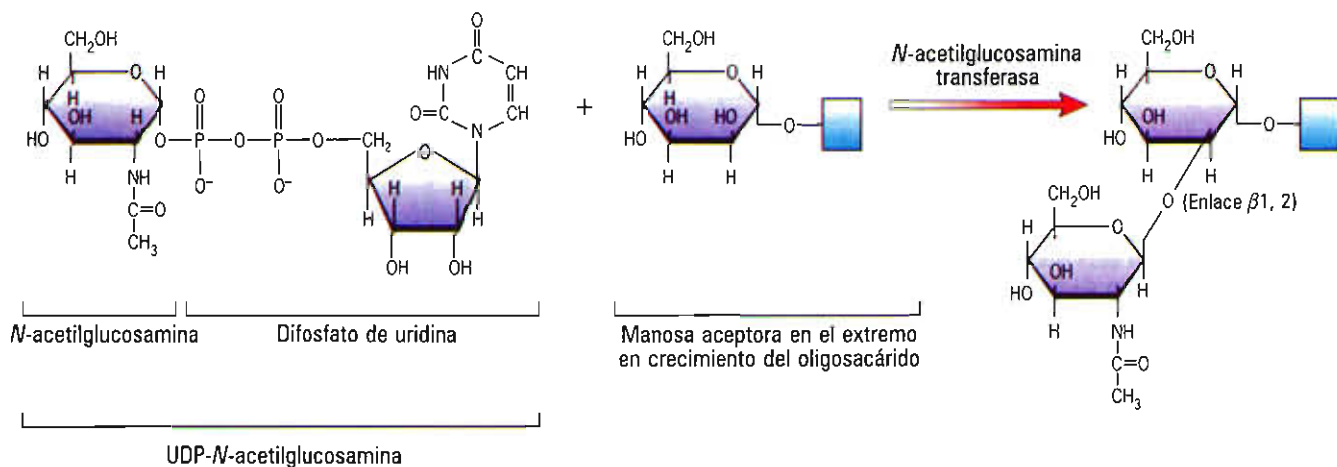
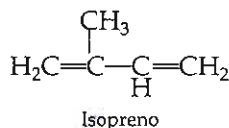


FIGURA 8-13. Ejemplos de una reacción catalizada por una glucosiltransferasa. Esta gran familia de enzimas transfiere azúcares desde un portador de azúcar nucleótido (en este caso UDP-*N*-acetilglucosamina) al extremo en crecimiento de una cadena de oligosacáridos (que en este caso contiene un residuo manosa en su extremo). Aquí se muestra la reacción particular según ocurre en el complejo de Golgi.

nera sin el empleo de plantillas. La adición de azúcares a la cadena creciente de oligosacárido es catalizada por un grupo de enzimas enlazadas a la membrana denominadas *glucosiltransferasas*, enzimas que transfieren un monosacárido específico procedente de un azúcar donador apropiado a un azúcar aceptor apropiado (fig. 8-13). La molécula donadora siempre es un azúcar nucleótido. Los ejemplos de azúcares nucleótidos donadores implicados en la construcción de cadenas de oligosacáridos son ácido siálico-CMP, manosa-GDP, fucosa-GDP, galactosa-UDP y UDP-*N*-acetilglucosamina (fig. 8-13). La molécula aceptor, que recibe el azúcar transferido, es el extremo en crecimiento de la cadena de carbohidratos. La secuencia de azúcares ensamblada a un oligosacárido depende de la secuencia particular de glucosiltransferasas que participa en su construcción, la cual, a su vez, en ocasiones depende de la disposición de las enzimas en la membrana y su especificidad por el sustrato.

En la figura 8-14 se muestran los pasos iniciales para añadir azúcares a oligosacáridos formados por enlaces *N* unidos a proteínas solubles e integrales de membrana. El segmento basal, o *núcleo*, de cada cadena de carbohidrato no se ensambla en la propia proteína, sino que se coloca de manera independiente sobre un transportador lípido y luego se transfiere, en bloque, al residuo asparagina específico del polipéptido. Este portador lípido, denominado **dolicol fosfato**, es una molécula hidrofoba construida con más de 20 unidades isopreno



integrada a la bicapa de lípidos de la membrana. Los azúcares se añaden a la molécula de dolicol fosfato, una a la vez, en el orden apropiado que indican las glucosiltransferasas enlazadas a la membrana. Esta parte del proceso de *N* glucosilación es prácticamente invariable; en las células de

mamíferos se inicia con la transferencia de *N*-acetilglucosamina 1-fosfato seguida por la transferencia de otra *N*-acetilglucosamina y a continuación de nueve unidades manosa y tres de glucosa en el patrón preciso indicado en la figura 8-14. A continuación, la enzima oligosacariltransferasa del portador lípido transfiere este bloque de azúcares al polipéptido naciente conforme dicho polipéptido se transloca a la luz del retículo endoplásmico.

Aunque algunos polisacáridos, particularmente de eucariotes inferiores, permanecen prácticamente como se muestra en la figura 8-14, la evolución de organismos más complejos se acompañó de la diversificación de grupos carbohidrato unidos a las proteínas. La modificación del núcleo oligosacárido se inicia en el RE al eliminar los residuos terminales de glucosa mediante glucosidasas. Los pasos restantes ocurren en la ruta hacia el complejo de Golgi y dentro del mismo como una etapa subsecuente en la vía biosintética (pág. 299).

Primer paso en el transporte vesicular

En condiciones típicas, las cisternas RER son cavidades amplias y aplanadas que actúan como conductos de transporte para desplazar proteínas de membrana y luminales desde su sitio de síntesis a los extremos apicales del RER. La superficie del borde apical de las cisternas RER de ordinario es lisa, o sea, desprovista de ribosomas (fig. 8-7, *b*). Estas partes del RE se conocen como *elementos de transición*, los cuales son sitios para formar el primer grupo de vesículas de transporte en la vía biosintética, vesículas que son dirigidas hacia el complejo de Golgi.

8-4 El complejo de Golgi

En 1898, el biólogo italiano Camilo Golgi, al trabajar con tejido nervioso que había impregnado durante varios días en un colorante con osmio, descubrió una red de color amarillo oscuro localizada cerca del núcleo de la célula. Esta

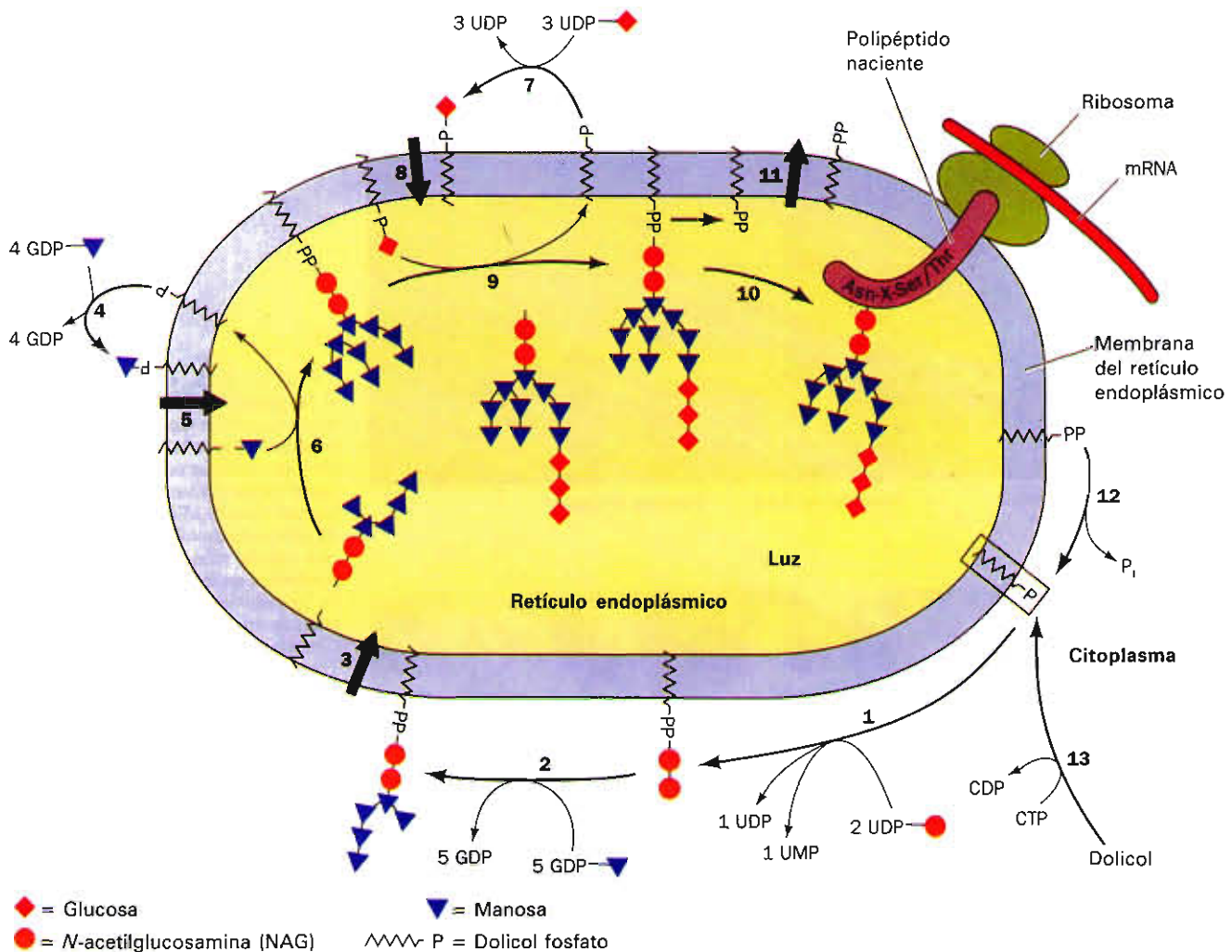


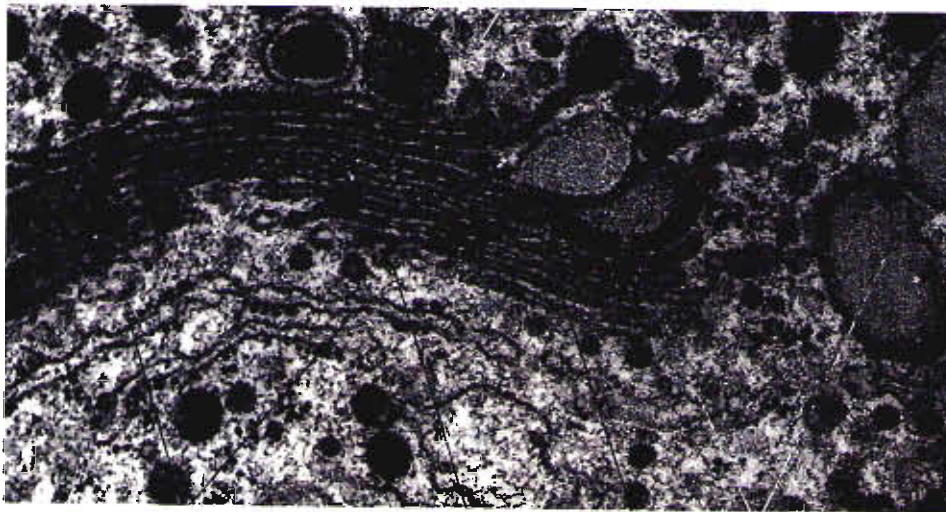
FIGURA 8-14. Pasos en la síntesis de la porción central de un oligosacárido N unido en el RE rugoso. Los primeros siete azúcares (cinco residuos de manosa y dos de NAG) se transfieren uno cada vez al dolicol-PP sobre el lado citoplásmico de la membrana del RE (pasos 1 y 2). En esta etapa, el dolicol con su oligosacárido unido al parecer pasa a través de la membrana (paso 3), y los azúcares restantes (cuatro residuos de manosa y tres de glucosa) se unen en el lado luminal de la membrana. Estos últimos azúcares se fijan, uno a la vez, al lado citoplásmico de la membrana, al extremo de la molécula dolicol fosfato (como en los pasos 4 y 7), que entonces viaja a través de la membrana (pasos 5 y 8) y dona su azúcar al extremo en crecimiento de la cadena de oligosacárido (pasos 6 y 9). Una vez que el oligosacárido está completamente ensamblado, se transfiere a un residuo asparagina del polipéptido naciente (paso 10). El dolicol-PP regresa a través de la membrana (paso 11) y está listo para iniciar la aceptación de azúcares una vez más (pasos 12 y 13).

red, que posteriormente se identificó en otros tipos de células, se denominó **complejo de Golgi** y ayudó a su descubridor a que se le otorgara el premio Nobel en 1906. Durante decenios, el complejo de Golgi fue motivo de controversia entre quienes creían que el organelo realmente existía en las células vivientes y aquellos que pensaban que era un *artefacto*, estructura artificialmente formada durante la preparación del tejido para la observación con microscopio. Sólo cuando se identificó claramente el complejo de Golgi en muestras no fijadas obtenidas mediante fractura por congelación se comprobó su existencia dentro de la célula *viviente* más allá de toda duda razonable.

El complejo de Golgi tiene morfología característica que consiste en cisternas aplanadas, discoides, con rebordes

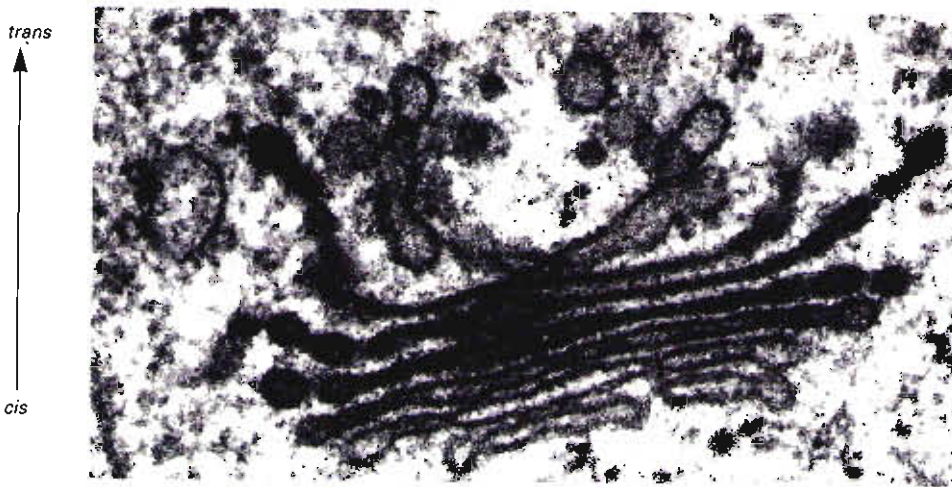
amplios relacionados con vesículas y túbulos (figs. 8-15 y 8-16). Las cisternas, cuyos diámetros de ordinario son de 0.5 a 1.0 μm , se disponen en pilas ordenadas, muy parecidas a pastelillos apilados e incurvadas de manera parecida a una copa poco profunda.² Típicamente, la pila de Golgi contiene menos de ocho cisternas; una célula individual puede contener desde unas cuantas hasta varios miles de pilas, según el tipo de célula. Puesto que las membranas del complejo de Golgi están desprovistas de ribosomas, se clasifican como membranas lisas, y luego de homogeneización aparecen en la fracción microsómica lisa (pág. 282).

² En las células vegetales, una sola pila de Golgi casi siempre se denomina **dictiosoma**.



Retículo endoplásmico con ribosomas Vesículas de Golgi Cisternas de Golgi

(a)



(b)

FIGURA 8-15. Complejo de Golgi. a) Micrografía electrónica de parte de una sola pila de Golgi mostrando vesículas cercanas a la cara *cis* y la gemación de vesículas secretorias mayores a partir de los extremos de la cisterna de la cara *trans*. b) Micrografía electrónica de una parte de célula de la cubierta de una raíz de tabaco mostrando la diferenciación de la cisterna de un extremo de la pila de Golgi al otro (ilustrada además en las siguientes figuras). (a: Cortesía de O. Kiermayer; b: cortesía de Thomas H. Giddings.)

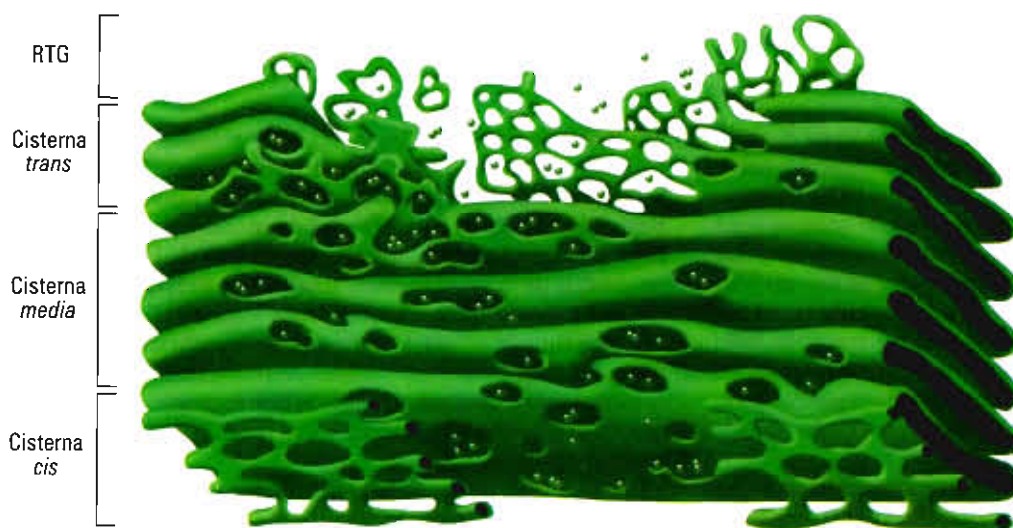


FIGURA 8-16. Dibujo de una parte del complejo de Golgi de una célula epitelial del conducto reproductor de la rata macho. Los elementos *cis* están interrumpidos para poder visualizar el compartimiento *medio*. Los elementos del compartimiento *trans* con frecuencia son discontinuos y aparecen como redes tubulares. (Según A. Rambourg y Y. Clermont, Eur. J. Cell Biol. 51: 195, 1990.)

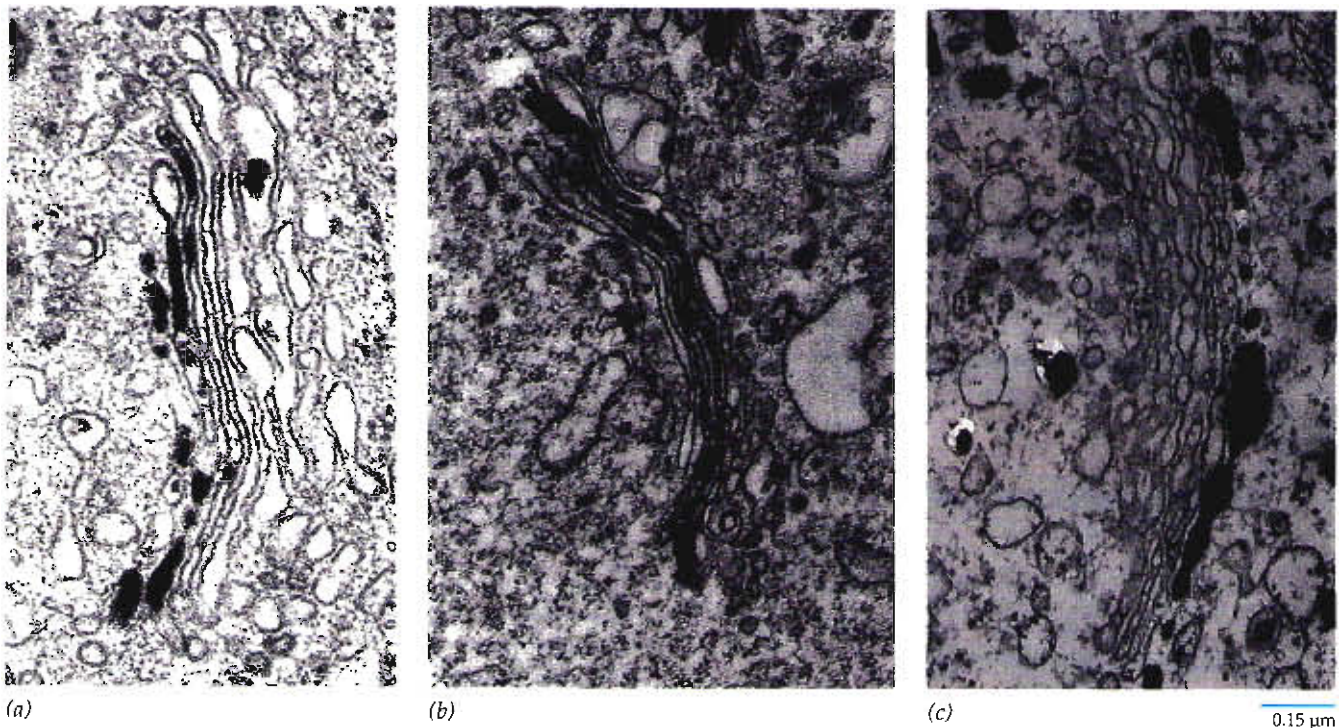


FIGURA 8-17. Diferencias regionales en la composición de la membrana a través de las pilas de Golgi. *a)* El tetróxido de osmio reducido impregna de manera preferencial las cisternas *cis* del complejo de Golgi. *b)* La enzima manosidasa II, que participa en la nivelación de los residuos manosa de la parte central del oligosacárido, según se describe en el texto, se localiza de preferencia en las cisternas *medias*. *c)* La enzima nucleósido difosfatasa, que procesa azúcares nucleótidos, se localiza de preferencia en las cisternas *trans*. (*a* y *c*: Según Robert S. Decker, J. Cell Biol. 61:603, 1974; *b*: según Angel Velasco y cols. J. Cell Biol. 122:41, 1993; todas con permiso de Rockefeller University Press.)

Las cisternas que constituyen las pilas de Golgi están polarizadas; las más próximas al RE se consideran en la cara *cis*, en tanto que las cisternas del extremo opuesto de la pila se encuentran en la cara *trans* (figs. 8-15, *b*, y 8-16). Estudios con diferentes técnicas demuestran que el complejo de Golgi no tiene composición uniforme de un extremo al otro. Por ejemplo, el osmio impregna de manera preferencial la cara *cis* (fig. 8-17, *a*). La enzima manosidasa II, concentrada en la cisterna *media* (fig. 8-17, *b*), elimina los residuos de manosa, en tanto que la difosfatasa de nucleósido, una enzima que desdobla dinucleótidos (p. ej., UDP), luego que dona sus azúcares se observa preferencialmente en la cara *trans* (fig. 8-17, *c*). Las vesículas membranosas derivadas de diferentes porciones del complejo de Golgi tienen una densidad lo bastante diferente para separarlas entre sí mediante gradientes de densidad (sección 17-6). Según estos y otros datos, el complejo de Golgi se divide en cuatro compartimientos funcionalmente distintos; las **cisternas *cis*, *media* y *trans***; y la **red *trans* de Golgi (RTG)** (fig. 8-16). Las diferencias en la composición de los compartimientos de la membrana de la cara *cis* respecto de la cara *trans* reflejan polaridad en las funciones del aparato de Golgi. Las proteínas de la membrana, secretorias y lisosómicas, recién sintetizadas abandonan el RE y penetran al complejo de Golgi a través de su cara *cis* y luego atraviesan la pila hacia la cara *trans*.

El complejo de Golgi es principalmente una planta procesadora. Las proteínas recién sintetizadas, que primero

fueron ensambladas en el RER, se modifican de manera secuencial específica conforme atraviesan la pila de Golgi: las enzimas proteolíticas recortan parte de su longitud; los aminoácidos pueden modificarse (p. ej., por hidroxilación de los aminoácidos de una molécula de colágena) y cambiar gradualmente su contenido de carbohidratos mediante una serie de reacciones enzimáticas (estudiadas más adelante). Una vez que las proteínas alcanzan la red *trans* de Golgi en el lado *trans* del organelo están listas para ser clasificadas y enviadas a su destino final dentro o fuera de la célula.

Desde hace tiempo se estableció claramente que hay movimiento de materiales a través del complejo de Golgi, pero hay dos puntos de vista contrastantes respecto de la vía donde ocurre. Hasta mediados del decenio de 1980 se pensaba que las cisternas de Golgi eran estructuras transitorias; se supuso que se formaban en la cara *cis* de la pila por fusión de las vesículas del RE y que cada cisterna se desplazaba físicamente desde el extremo *cis* al extremo *trans* de la pila cambiando su composición conforme avanzaba. Este modelo se conoce como de *maduración*, puesto que propone que cada cisterna *cis* "madura" para convertirse en una cisterna *trans*. Se supone que cuando una cisterna alcanza la cara *trans* se fragmenta en vesículas que llevan los materiales a otros destinos. Aunque los defensores del modelo de maduración del complejo de Golgi no lo abandonaron por completo, fue reemplazado principalmente por un modelo alterno que sostiene que las cisternas de una pila de

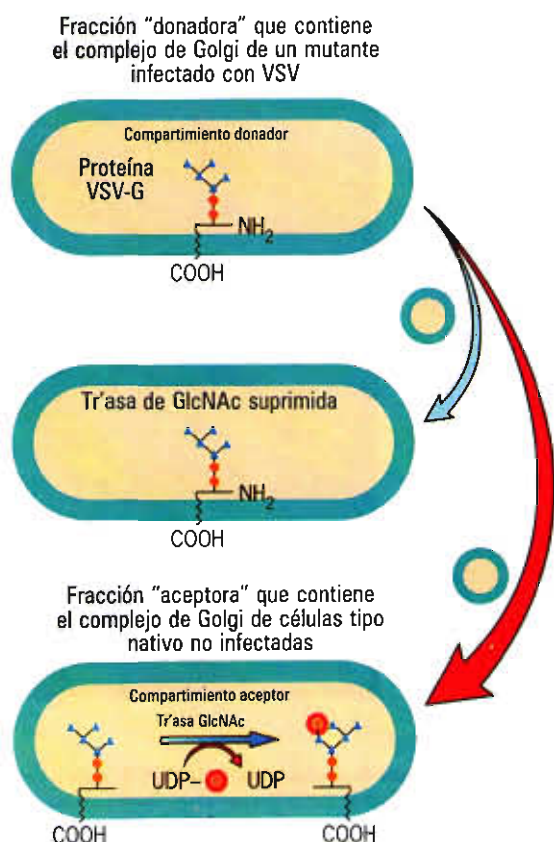


FIGURA 8-18. Diseño de un experimento que apoya la hipótesis de que los materiales se desplazan entre los compartimientos de Golgi por medio de vesículas de transporte. La fracción donadora que contiene membranas de Golgi se prepara a partir de células mutantes (que carecen de la enzima *N*-acetilglucosamina transferasa) infectadas con virus de la estomatitis vesicular (VSV). La proteína G codificada por el genoma viral se sintetiza y glucosila en el RE rugoso, pero no puede haber la segunda vuelta de glucosilación que normalmente ocurre en el complejo de Golgi. Cuando se incuban estas membranas con una fracción aceptora que también contiene membranas de Golgi, pero preparada a partir de células nativas no infectadas (células que poseen *N*-acetilglucosamina transferasa), la proteína G de la fracción donadora es glucosilada. La glucosilación puede observarse incubando el donador mezclado con fracciones aceptoras en presencia de UDP-*N*-acetilglucosamina marcada con isótopos radiactivos (indicada por el círculo rojo). Esta reacción sólo puede ocurrir si las vesículas de la fracción donadora se fusionan con las membranas de la fracción aceptora, de modo que la proteína G no concluida pueda entrar en contacto con la transferasa presente en la luz de las membranas aceptoras. (Según J.E. Rothman y L. Orci, *FASEB J.* 4:1463, 1990.)

Golgi permanecen en su sitio como entidades estables reunidas por un armazón de proteínas. En este último modelo, los materiales se desplazan a través de la pila de Golgi, desde la cara *cis* a la red *trans* de Golgi mediante vesículas formadas por gemación de un compartimiento de la membrana que se fusionan con un compartimiento vecino por fuera de la pila, como se muestra en la figura 8-2.

Las pruebas citadas con mayor frecuencia para apoyar este último modelo provienen del empleo de sistemas de células aisladas donde se reconstituyen las vesículas de trans-

porte (fig. 8-18). En estos estudios, efectuados por James Rothman y Lelio Orci, se prepararon dos muestras de fracciones de membrana derivadas del complejo de Golgi de células cultivadas de ovario de cobayo chino (OCC).

- Una fracción ("fracción donadora") se obtuvo de células infectadas con virus de la estomatitis vesicular, patógeno cuya información genética codifica una proteína integral de membrana (VSV-G) sintetizada en el RER y glucosilada en el complejo de Golgi de las células infectadas. Las células infectadas que suministraron la fracción donadora eran mutantes genéticos que carecían de la enzima que transfiere el azúcar *N*-acetilglucosamina transferasa, normalmente residente en la cisterna *media* del complejo de Golgi que cataliza la reacción mostrada en la figura 8-13.
- La otra fracción ("fracción aceptora") se obtuvo de células tipo nativo no infectadas que sí contenían la enzima que transfiere el azúcar.

Cuando las dos fracciones se mezclaron con todos los factores solubles y también *N*-acetilglucosamina marcada con isótopos radiactivos en las condiciones requeridas para la formación y transferencia de vesículas, se observó aparición de radiactividad en el dominio luminal de la proteína VSV-G por adición progresiva de *N*-acetilglucosamina. Esto sólo puede ocurrir si las membranas donadoras que contienen VSV-G son transportadas a membranas aceptoras que contienen *N*-acetilglucosamina transferasa (fig 8-18). Consideraremos ahora con mayor detalle el mecanismo de transporte de vesículas.

Viaje desde el retículo endoplásmico hasta el complejo de Golgi a través de los compartimientos de Golgi

Con el microscopio electrónico se observa que las vesículas formadas por gemación del RE o de las cisternas *cis* y *media* del complejo de Golgi están revestidas en su superficie externa por una "cubierta vellosa" más bien indiferenciada. Si las células se tratan con moléculas de estructura similar a GTP (análogos GTP), pero que a diferencia del GTP no se hidrolizan, estas vesículas revestidas se acumulan dentro de la célula (fig. 8-19) y pueden aislarse de células homogeneizadas mediante gradientes de densidad (sección 17-6). Las vesículas revestidas se acumulan en presencia de un análogo GTP no hidrolizable debido a que la cubierta contiene la proteína enlazada a GTP llamada *factor de adenosilación de ribosa* (FAR), que debe hidrolizar al GTP enlazado antes que el revestimiento pueda desensamblarse. La hidrólisis de GTP y el desensamblado del revestimiento normalmente ocurren antes de la fusión de vesículas con una membrana específica, lo que sugiere que FAR participa en el proceso de reconocimiento entre la membrana vesicular y su objetivo específico (pág. 297). Si hay coincidencia apropiada entre las dos membranas se presume que la hidrólisis de GTP actúa como interruptor para despejar la vía para la fusión de la membrana.

Además del FAR, la vesícula contiene un complejo de siete proteínas de revestimiento, distintas pero relacionadas,

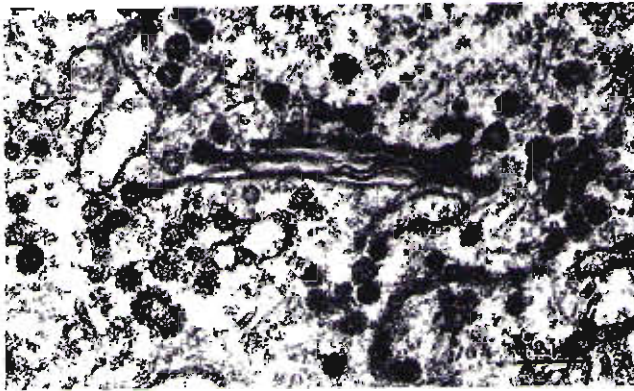
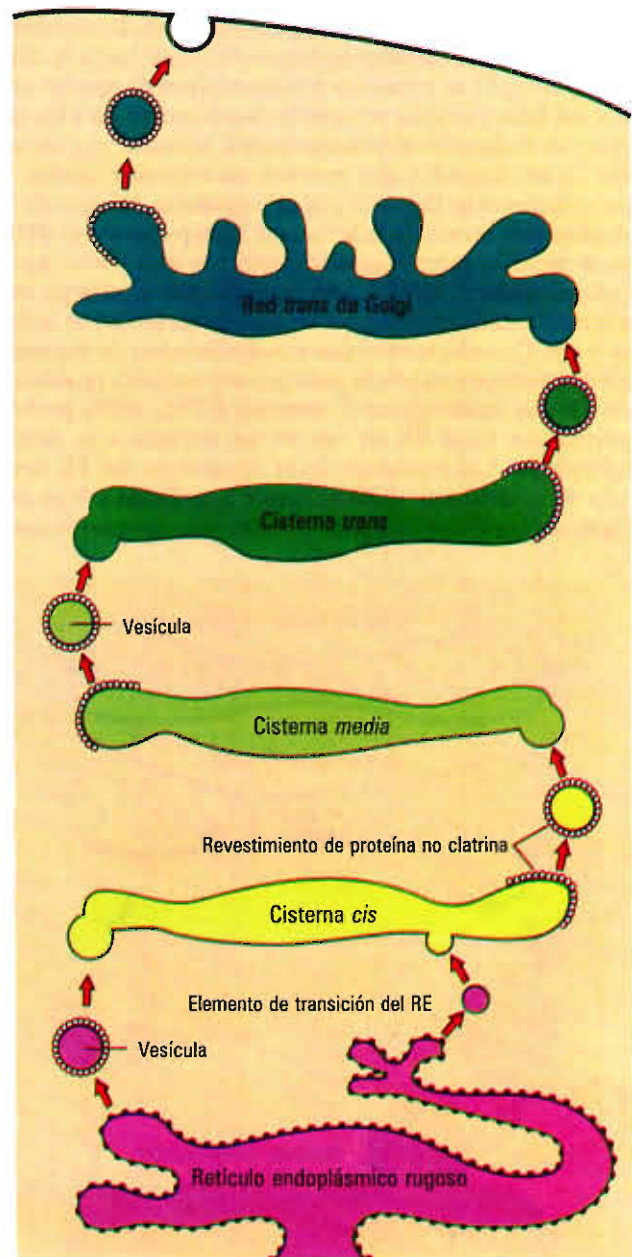


FIGURA 8-19. Acumulación de vesículas recubiertas de proteína no clatrina. Las micrografías muestran el complejo de Golgi de una célula permeabilizada mediante tratamiento con un análogo GTP no hidrolizable (GTPγS). Se observan numerosas vesículas recubiertas derivadas del complejo de Golgi y de yemas recubiertas sobre las membranas de Golgi. El recubrimiento de estas membranas contiene algunas proteínas denominadas de revestimiento, que se distinguen de otro grupo de vesículas recubiertas (vesículas recubiertas de clatrina), descritas al final del capítulo. (Según James E. Rothman y Lelio Orci, FASEB J. 4:1467, 1990.)

aisladas de organismos tan diversos como mamíferos y levaduras. Las vesículas recubiertas con proteínas de revestimiento se conocen como *vesículas no recubiertas con clatrina*, para distinguirlas de otro tipo de vesículas recubiertas que estudiaremos con detalle posteriormente. Las vesículas revestidas con proteínas de revestimiento al parecer no son selectivas porque incluyen cualquier proteína en su membrana y transportan cualquier carga soluble que no tenga restricciones específicas para abandonar el compartimento donador. Muchas pruebas indirectas sugieren que las vesículas con proteínas de revestimiento (u otras vesículas no revestidas con clatrina) participan en un proceso de **flujo en masa**, en el cual las vesículas desplazan continuamente membrana, materiales y líquidos de un compartimento a otro, desde el RE a través del complejo de Golgi y finalmente a la membrana plasmática (fig. 8-20, a). En la figura 8-20, b, se muestra el ensamblado de la vesícula recubierta con proteínas de revestimiento.

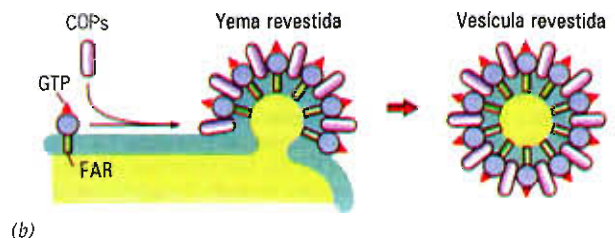
Según este punto de vista del transporte de vesículas, una proteína localizada en la membrana, en la luz del RE o en el complejo de Golgi "automáticamente" será transportada de un compartimento al siguiente y con el tiempo a la superficie de la célula, a menos que contenga información

para: 1) ser retenida en el compartimento donde reside o 2) ser derivada (dirigida específicamente) a un destino particular diferente de la membrana plasmática, como el lisosoma o una vesícula secretoria regulada. En las siguientes seccio-



(a)

FIGURA 8-20. Flujo en masa entre los compartimentos membranosos mediado por vesículas recubiertas de proteína no clatrina. a) Las vesículas de transporte mostradas en este diagrama son iguales a las presentadas en la figura 8-19. Estas vesículas están cubiertas en su superficie externa por un revestimiento de proteínas no clatrina (p. ej.: proteínas de revestimiento). Se cree que las vesículas de este tipo transportan membranas y cargas solubles de manera indiscriminada desde un compartimento al siguiente a través de la célula. b) Dibujo esquemático del ensamblado de una vesícula recubierta por proteínas de revestimiento.



(b)

nes consideraremos con mayor detalle cada uno de estos factores.

Proteínas retenidas en el RE

Si las vesículas se encuentran en gemación continua dentro de los compartimientos de la membrana, ¿cómo retiene cada compartimiento su composición única?. Por ejemplo, ¿qué determina si una proteína dada presente en la membrana del RE debe permanecer en éste o proseguir hacia la cisterna de Golgi? Las proteínas que normalmente residen en la luz del RER (como la proteindisulfuro isomerasa y los chaperones moleculares) poseen como C terminal una secuencia de aminoácidos que provoca su retención dentro del compartimiento (fig. 8-21). Si una proteína del retículo endoplásmico carece de la secuencia lis-asp-glu-leu (o KDEL, en la nomenclatura de una sola letra) no será retenida en el compartimiento del RE, sino transportada a lo largo de la vía biosintética en vesículas de transporte (como en la figura 8-20). Cuando se efectúan manipulaciones de ingeniería genética sobre una célula para que exprese una proteína no de RE que contenga un C terminal KDEL, dicha proteína permanece en el RE en vez de ser enviada a su destino apropiado. Las proteínas de la membrana del RE tienen una señal diferente (KKXX, donde K es lisina y X es cualquier aminoácido), que de manera similar asegura su retención

dentro del organelo. Cada compartimiento de membrana en la vía biosintética puede tener señales propias de retención, lo que ayuda a explicar cómo cada compartimiento puede mantener su dotación de proteínas únicas frente al movimiento continuo de vesículas hacia adentro y afuera de esa región.

Los datos sugieren que las proteínas residentes en el retículo endoplásmico que “accidentalmente” escapan del RE no se alejan mucho de la vía biosintética, sino que son recicladas a partir de la cisterna *cis* de Golgi de regreso al RE (fig. 8-21). Esta observación indica que el tráfico de membrana ocurre no sólo del RE al complejo de Golgi (la llamada vía *anterógrada*), sino también en la dirección opuesta (*retrógrada*). A partir del tratamiento de las células con *brefeldin A* (BFA), fármaco obtenido de células de hongos, se derivaron datos adicionales para el transporte retrógrado. El tratamiento con BFA conduce a la desaparición del complejo de Golgi y desplazamiento de las proteínas de Golgi residentes al interior del retículo endoplásmico. El *brefeldin A* actúa al impedir la formación de vesículas revestidas, al bloquear el tráfico de membrana del RE al de Golgi, pero no a la inversa. En ausencia de tráfico anterógrado, se puede esperar que el movimiento retrógrado de las vesículas genere transporte de la membrana de Golgi hacia la membrana del retículo endoplásmico.

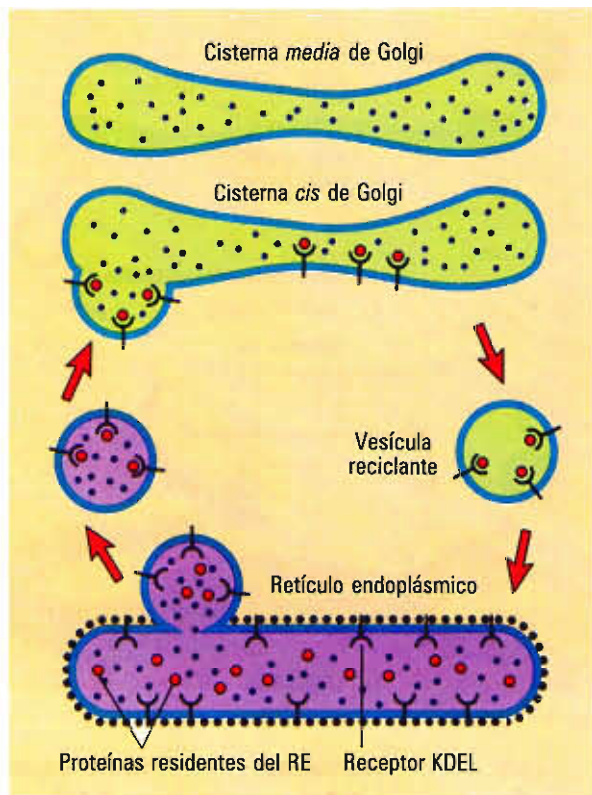


FIGURA 8-21. Retención de proteínas del retículo endoplásmico.

Las proteínas residentes del RE contienen una secuencia de aminoácidos (KDEL) que provocan su retención dentro del compartimiento. Se cree que la retención ocurre conforme las proteínas RE se unen de manera específica a un receptor KDEL. Las proteínas con una secuencia KDEL que escapan del RE en una vesícula de transporte, al parecer regresan de los compartimientos *cis* de Golgi mediante un mecanismo de reciclamiento.

Orientación de las vesículas hacia un compartimiento particular

La mayor parte de los factores aislados que participan en el transporte de vesículas desempeñan un papel inespecífico en el proceso, pero hay pruebas de que la fusión de la vesícula es específica. Por ejemplo, las vesículas del RE se fusionan con la cisterna *cis* de Golgi y no con la cisterna *media*. De manera similar, las vesículas de la cisterna *media* de Golgi sólo se fusionan con la cisterna *trans*. La fusión selectiva es uno de los factores que garantiza un flujo altamente orientado a través de los compartimientos membranosos de la célula.

Se han aislado proteínas, particularmente de células nerviosas, que median la fusión de membranas específicas. Por ejemplo, la membrana plasmática de una neurona pre-sináptica contiene una proteína denominada *syntaxina*, que se une específicamente a una proteína denominada *proteína de membrana relacionada con vesículas* (PMRV, también conocida como *sinaptobrevina*) localizada en la membrana de las vesículas sinápticas. Se cree que la interacción entre estas dos proteínas media la fusión de la membrana y la liberación del neurotransmisor (pág. 159). Aunque levaduras y mamíferos están separados por más de mil millones de años de evolución y las células de las levaduras no efectúan ninguna actividad análoga a la transmisión sináptica, estas primitivas células eucariotas contienen familias de genes que codifican proteínas muy similares a *syntaxina* y proteínas de membrana relacionadas con vesículas. Se ha propuesto que estas proteínas son miembros de un par de familias de proteínas que median el transporte vesicular en todas las células eucariotas. Las proteínas similares a las proteínas de membrana relacionadas con vesículas son miembros de la familia *v-SNARE* y se ubican en las membranas de vesículas de transporte. Proteínas similares

FIGURA 8-22. Se piensa que la especificidad del encuentro y fusión de las vesículas se logra a través de interacciones específicas entre proteínas sobre la membrana vesicular y proteínas complementarias sobre la membrana del compartimiento al cual se dirigen. *a)* Se ha postulado que las proteínas de la membrana vesicular son miembros de una familia v-SNARE, en tanto que las proteínas del compartimiento al cual se dirigen de manera específica son miembros de una familia t-SNARE. Conforme las vesículas de la membrana se forman por gemación a partir de un compartimiento donador, recogen las proteínas específicas v-SNARE que les permiten encontrarse con la membrana específica apropiada que contiene una membrana complementaria t-SNARE. *b)* Diagrama de un ciclo de gemación y encuentro. Además de contener una v-SNARE, la vesícula en gemación del compartimiento donador está cubierta por un revestimiento de proteína no clatrina. El revestimiento se desensambla antes del encuentro con la membrana específica. Para el proceso de encuentro también se requieren algunas otras proteínas (marcadas como SNAP y NSF).

a la syntaxina son miembros de la familia t-i y se localizan en la membrana aceptora (específica). Se cree que interacciones específicas entre t-SNARE y v-SNARE (fig. 8-22) gobiernan el encuentro y la fusión de las vesículas. En esta hipótesis, por ejemplo, una v-SNARE de una vesícula derivada del RE se une a t-SNARE en una cisterna *cis* de Golgi, pero no a t-SNARE en una membrana lisosómica.

Orientación de las proteínas de la vía biosintética

A pesar de todos los comentarios de las vesículas de transporte, aún debemos explicar cómo una proteína particular sintetizada en el RE se secreta en una vesícula particular. Es importante que una célula tenga capacidad para distinguir entre los diferentes materiales que elabora. Por ejemplo, una célula pancreática tiene que separar enzimas digestivas recién sintetizadas y destinadas a ser secretadas de enzimas lisosómicas recién sintetizadas destinadas al lisosoma. Se cree que esta especie de proceso de clasificación para separar proteínas marcadas hacia diferentes destinos en vesículas diferentes ocurre en los últimos compartimentos de Golgi, o sea, la red *trans* de Golgi (RTG). El microscopio electrónico revela que la RTG por lo general se compone de elementos tubulares interconectados en la vecindad de la cisterna *trans* más interna (fig. 8-16).

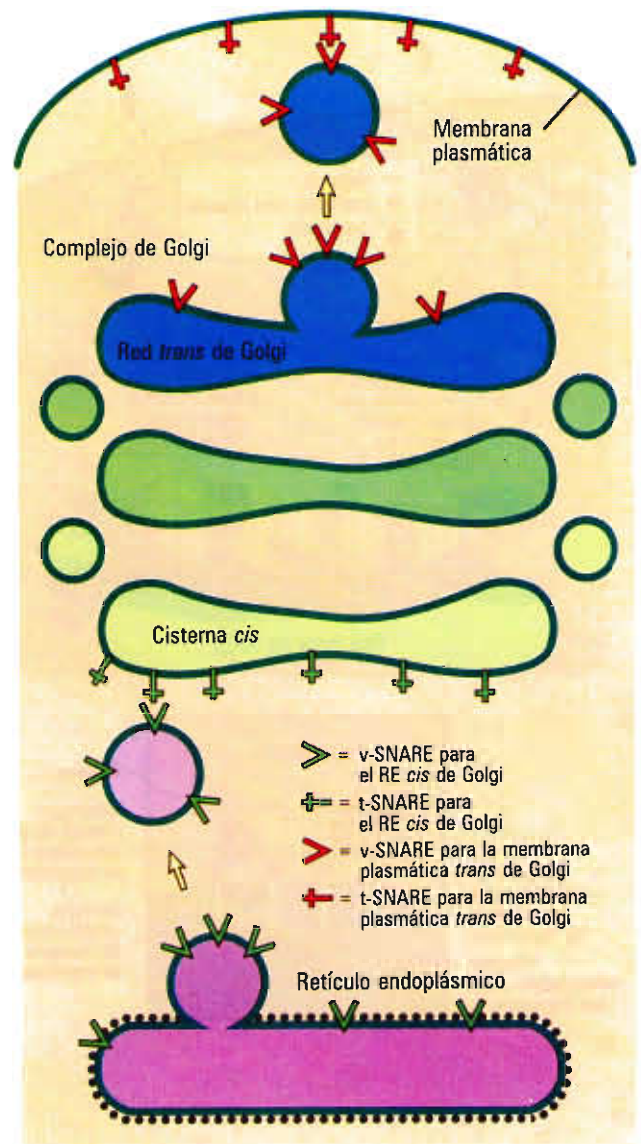
En la RTG se originan dos tipos de vesículas:

1. Vesículas no selectivas, no recubiertas de clatrina (fig. 8-20, *a*), que llevan materiales (como colágeno y fibronectina) secretados continuamente por las células (o sea, secreción elemental) y también proteínas integrales de membrana que continuamente se añaden a la membrana plasmática.
2. Vesículas selectivas recubiertas de clatrina que llevan cargas seleccionadas, como productos secretorios regulados y enzimas lisosómicas marcadas para sitios específicos.

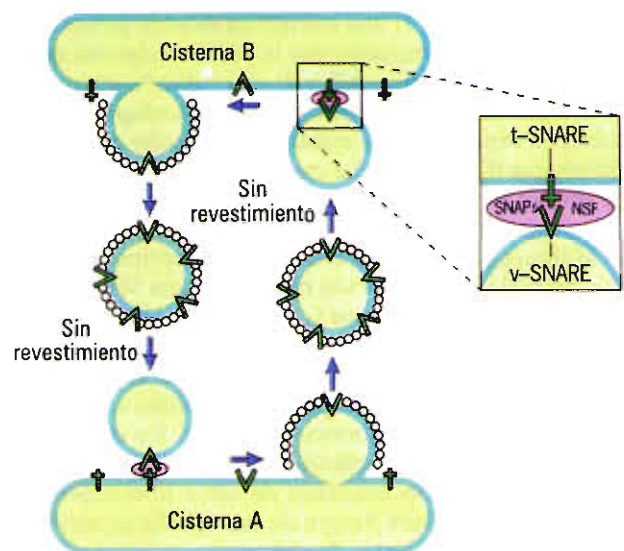
Ya analizamos la estructura y actividades de las vesículas no recubiertas de clatrina; ahora retornaremos a la variedad recubierta de clatrina.

Estructura y función de las vesículas recubiertas de clatrina de la red *trans* de Golgi

La estructura de las vesículas recubiertas de clatrina se describe con detalle en la página 313. El revestimiento de estas



(a)



(b)

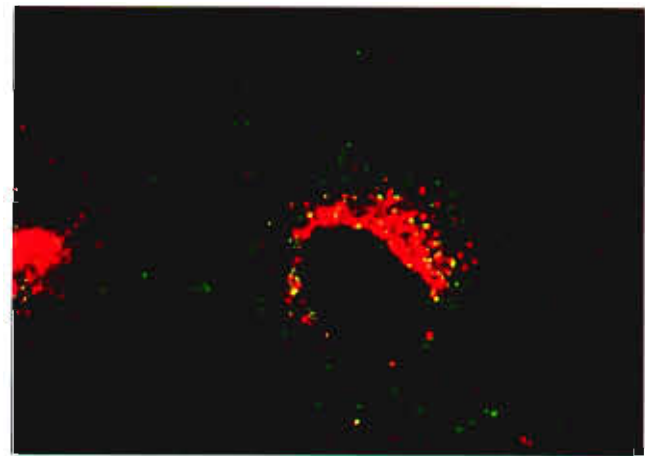
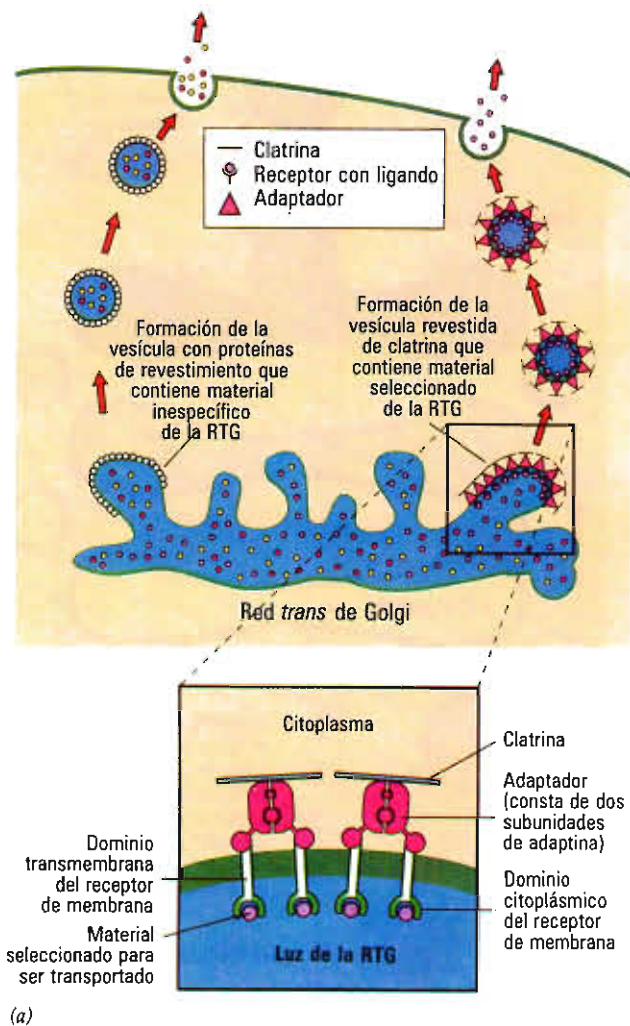


FIGURA 8-23. Formación en la RTG de fosillas que contienen adaptina y están recubiertas de clatrina. *a)* Se pueden observar cuando menos dos tipos distintos de vesículas recubiertas en gemación sobre la membrana de la red *trans* de Golgi. Las vesículas recubiertas por proteína no clatrina no muestran selectividad respecto de la carga que transportan, en tanto que las vesículas recubiertas de clatrina transportan materiales capaces de enlazarse a receptores específicos de membrana. Los receptores de membrana se incorporan selectivamente en las vesículas recubiertas de clatrina como consecuencia de una unión específica entre los extremos de las proteínas de membrana y la capa de adaptadores que los rodean (mostrada en el recuadro). Los adaptadores, a su vez, poseen sitios de enlace para la red más externa de moléculas de clatrina. *b)* Como se analiza posteriormente en el capítulo, se pueden distinguir dos tipos de vesículas recubiertas de clatrina, un tipo formado por gemación de la red *trans* de Golgi de las pilas de Golgi, y el otro que se forma por gemación a partir de la membrana plasmática. Estos dos tipos de vesícula se distinguen por los tipos de moléculas de adaptina que componen los adaptadores. Las vesículas formadas por gemación de la RTG contienen γ -adaptina, cuya localización en estas células se revela por anticuerpos fluorescentes rojos. Las vesículas formadas por gemación de la membrana plasmática contienen α -adaptina, cuya localización se revela por anticuerpos fluorescentes verdes. (*b)* Según Margaret S. Robinson, Trends in Cell Biol. 2:294, 1992.)

vesículas contiene: 1) una estructura externa parecida a un panal de abejas compuesto por la proteína clatrina que forma un bastidor estructural, y 2) una cubierta interna compuesta de complejos proteínicos llamados **adaptadores**, que cubren la superficie de la membrana vesicular enfrentada al citoplasma (fig. 8-23, *a*). La masa de cada adaptador consta de un par de proteínas llamadas *adaptinas*, cuya localización dentro de la región de la red *trans* de Golgi se muestra en la figura 8-23, *b*. Se piensa que las adaptinas proporcionan parte de la información requerida para la clasificación de proteínas. Los extremos C terminal de las moléculas de adaptina forman un par de "orejas" proyectadas desde el cuerpo del complejo adaptador. Se cree que estas prolongaciones semejantes a orejas pueden enlazarse a las colas de los receptores de membrana. A su vez, los receptores se enlazan a ligandos específicos dentro de la luz de la vesícula (fig. 8-23). Como resultado de estas interacciones, los materiales específicos dentro de la vesícula se concentran en vesículas no cubiertas de clatrina.

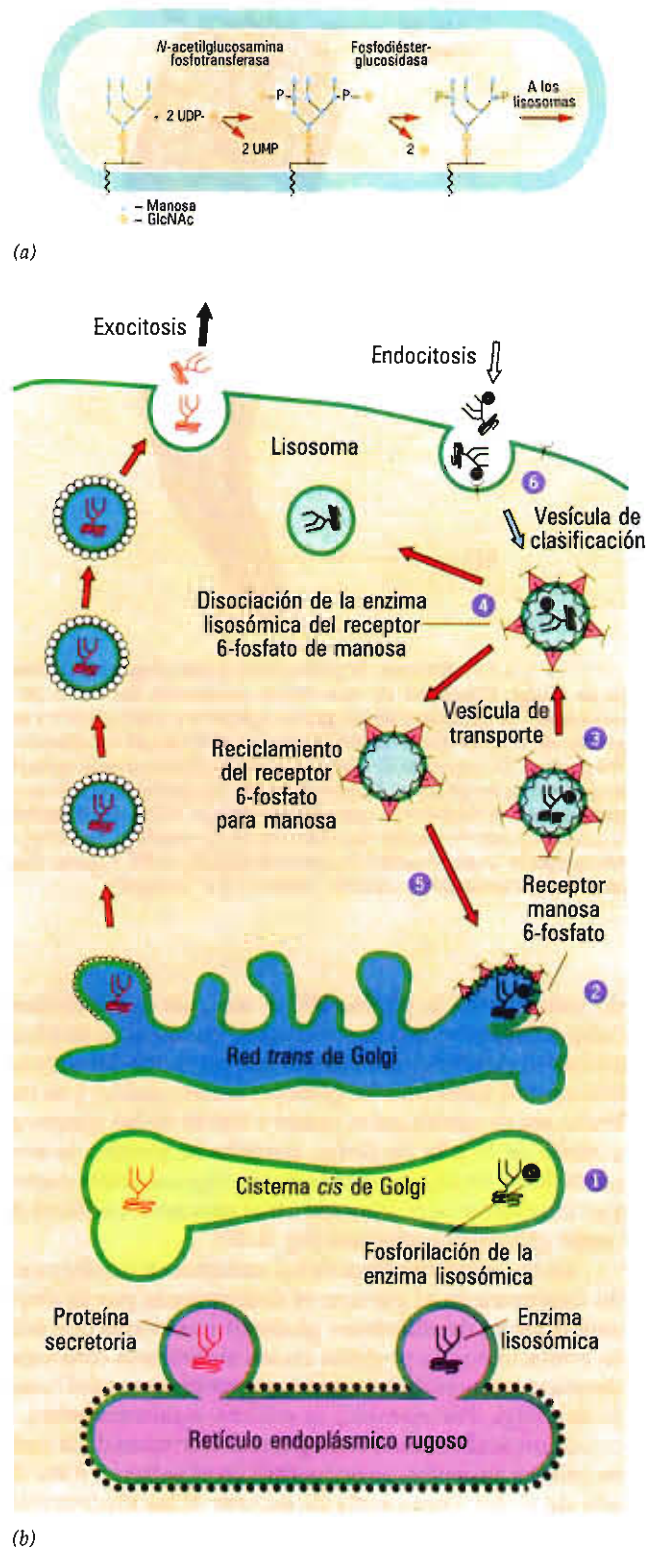
Clasificación de las proteínas lisosómicas. La clasificación de las proteínas lisosómicas ilustra la manera de operar de algunos componentes de una vesícula recubierta de clatrina. Las proteínas lisosómicas se ensamblan a ribosomas enlazados a la membrana del RE y se transportan a la cisterna *cis* de Golgi junto con otros tipos de proteínas. Sin embargo, ya en la cisterna de Golgi, las enzimas que añaden un grupo fosfato a los azúcares manosa de las cadenas de carbohidrato unidas por enlaces *N* reconocen a las proteínas lisosómicas (fig. 8-24, *a*). Por lo tanto, a diferencia de otras glucoproteínas clasificadas en la red *trans* de Golgi, las enzimas lisosómicas poseen residuos manosa fosforilados que actúan como señales de reconocimiento. Las enzimas lisosómicas que llevan esta señal son reconocidas y "capturadas" por los **receptores manosa 6-fosfato**, los cuales son proteínas integrales de membrana de la red *trans* de Golgi (fig. 8-24, *b*). Este aspecto del mecanismo de clasificación está bien establecido, pero la demostración para el resto del cuadro es más circunstancial.

FIGURA 8-24. Mecanismo para enviar las enzimas lisosómicas a los lisosomas. a) Las enzimas lisosómicas son reconocidas por una enzima en la cisterna *cis* que transfiere una *N*-acetilglucosamina fosforilada desde un azúcar nucleótido donador a uno o más residuos manosa de oligosacáridos *N* unidos. A continuación se elimina la porción glucosamina en un segundo paso mediante una segunda enzima que deja residuos de manosa-6-fosfato como parte de la cadena del oligosacárido. b) Diagrama que muestra las vías seguidas por: 1) una proteína (rojo) secretada de manera elemental (como la fibronectina), y 2) una enzima lisosómica (negro). Los residuos manosa de la enzima lisosómica se fosforilan en las cisternas de Golgi (paso 1) y luego se incorporan selectivamente en una vesícula recubierta por clatrina en la RTG (paso 2). Se cree que los receptores manosa 6-fosfato tienen un doble papel: interactúan de manera específica con las enzimas lisosómicas en el lado luminal de la vesícula y también específicamente con adaptinas sobre la superficie citoplásmica de la vesícula (paso 3). Los receptores manosa 6-fosfato al parecer se separan de las enzimas antes de la formación del lisosoma (paso 4) y regresan al complejo de Golgi (paso 5). Los receptores manosa 6-fosfato también están presentes en la membrana plasmática, donde pueden capturar enzimas lisosómicas secretadas en el espacio extracelular y retornarlas a una vía que las dirige hacia el lisosoma (paso 6).

Se cree que los receptores manosa 6-fosfato de la RTG pueden tener sitios de enlace en ambos lados de la membrana de la red *trans* de Golgi. Aunque una parte del receptor se proyecta a la luz de la RTG y se enlaza a una enzima lisosómica, otra parte se proyecta al interior del citoplasma y se enlaza a una molécula de adaptina en uno de los complejos adaptadores ensamblados en la superficie de la membrana de la red *trans* de Golgi (fig. 8-24, b). Una vez formada, la vesícula de clatrina recubierta que surge por gemación de la RTG debe orientarse a un destino particular. Por ejemplo, las vesículas recubiertas contienen enzimas lisosómicas que deben orientarse a un lisosoma (o a un endosoma que posteriormente se convertirá en un lisosoma, página 311). Presumiblemente, cada vesícula de transporte que sufre un proceso de gemación en la membrana lleva consigo proteínas específicas derivadas de la membrana donadora capaces de fijarse a receptores específicos sobre la membrana aceptora para iniciar la fusión. En la figura 8-22 se muestran las v-SNARE y t-SNARE que pueden mediar este proceso.

Glucosilación en el complejo de Golgi

La función definida con mayor claridad del complejo de Golgi es el ensamblado de carbohidratos. El complejo de Golgi es el sitio donde se concluye el ensamblado de oligosacáridos a glucoproteínas y glucolípidos. El complejo de Golgi también es sitio de síntesis de la mayor parte de los complejos polisacáridos de la célula, incluyendo, por ejemplo, los glucosaminoglicanos observados en la matriz extracelular de células animales o las pectinas y la hemicelulosa que se encuentran en las paredes celulares de las plantas (fig. 7-35, c). El papel del complejo de Golgi en la glucosilación se demostró por primera vez mediante autoradiografía en células caliciformes intestinales que secretan grandes cantidades de mucina, una proteína con alto contenido de azúcar. Cuando se expone esta célula a azúcares marcados con isótopos radiactivos se observa que pri-



mero se incorporan al interior del complejo de Golgi (fig. 8-25).

El complejo de Golgi es una estación principal de procesamiento a lo largo de la vía biosintética (fig. 8-2). Cuan-

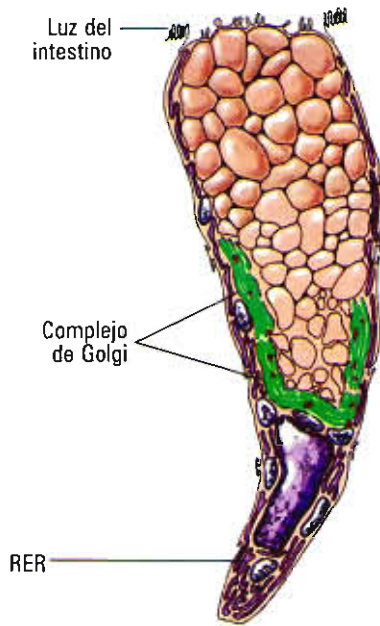


FIGURA 8-25. Síntesis de polisacáridos complejos en el complejo de Golgi. Diagrama de una célula caliciforme del colon de rata mostrando la ubicación de los granos plateados (rojo) en autorradiografías de células fijadas inmediatamente después de incubación con ^3H -glucosa. El complejo de Golgi se muestra intensamente radiactivo, lo que indica su papel en la incorporación de residuos de azúcar a las cadenas de carbohidrato que constituyen la masa de la secreción mucosa. La incorporación de azúcares en el complejo de Golgi contrasta con la incorporación de aminoácidos en el RE rugoso. (Basado en el trabajo realizado por Marian Neutra y C.P. Leblond.)

do tratamos en la página 290 el tema de la formación de cadenas de carbohidratos N unidas, los residuos de glucosa acababan de ser eliminados de los extremos del oligosacárido central. Conforme las glucoproteínas solubles y de membrana recién sintetizadas pasan a través de las cisternas *cis* y *media* de la pila de Golgi, también se pierden la mayor parte de los residuos manosa de los oligosacáridos centrales y se añaden secuencialmente otros azúcares mediante diferentes glucosiltransferasas (fig. 8-26).

La organización final de los azúcares en un oligosacárido determinado al parecer es determinada por la disposición espacial de diferentes glucosiltransferasas que entran en contacto con la proteína recién sintetizada conforme se desplaza a través de las cisternas membranosas del complejo de Golgi. Por ejemplo, la enzima sialiltransferasa, que coloca un ácido siálico en la posición terminal de la cadena en células animales, se encuentra en el extremo *trans* de la pila de Golgi, como sería de esperar si las glucoproteínas recién sintetizadas se desplazaran continuamente hacia esta parte del organelo. En contraste, las proteínas residentes del RER carecen de azúcares que normalmente se añaden en las cisternas de Golgi *media* y *trans*, como ocurriría a proteínas que nunca alcanzan esta parte de la pila de Golgi. A diferencia de los oligosacáridos N unidos, los que se fijan a proteínas por uniones O se ensamblan por completo en el complejo de Golgi.

Exocitosis: etapa terminal de la secreción

Las células que participan en la secreción regulada, como las que se muestran en la figura 8-8, típicamente contienen un gran número de vesículas secretorias (también llamadas **gránulos secretorios**) apiñadas cerca de sus superficies apicales. Los gránulos secretorios se originan de vesículas recubiertas de clatrina que sufren gemación en la red *trans* de Golgi. Conforme las vesículas secretorias se desplazan a la superficie apical de la célula, el contenido de las vesículas se concentra cada vez más a medida que el agua sale de las vesículas hacia el citoplasma. En las células nerviosas, las vesículas que contienen sustancias neurotransmisoras sufren gemación de la RTG localizada cerca del núcleo de la célula y a continuación se transportan al extremo del axón, distancia que puede ser de varios metros en un vertebrado de gran tamaño.

Para que un gránulo secretorio descargue su contenido es necesario que la membrana del gránulo y la membrana plasmática suprayacente entren en contacto y en seguida se fundan, generando así una abertura a través de la cual se puede liberar el contenido del gránulo (fig. 8-27, *a,b*). Este proceso de fusión de membranas y descarga del contenido, que se denomina **exocitosis**, de ordinario se desencadena cuando la concentración local de iones calcio aumenta. Por ejemplo, en la página 159 se hizo notar que la llegada de un impulso nervioso al botón terminal de una neurona incrementa el flujo hacia adentro de Ca^{2+} con la subsecuente descarga de moléculas de neurotransmisor mediante exocitosis. La inyección de soluciones de calcio dentro de las células que participan en la secreción regulada provoca la descarga total del producto secretorio.

Las etapas de la exocitosis (o de cualquier tipo de fusión regulada de membranas) son un proceso todavía no bien comprendido. El contacto entre la membrana de una vesícula secretoria y la membrana plasmática es mediado por algunas de las llamadas "proteínas de fusión" situadas en la superficie y dentro de la membrana. La función aparente de estas proteínas es establecer contactos a corta distancia entre membranas específicas destinadas a interactuar y fusionarse. Se cree que el contacto entre las membranas puede causar la formación de un pequeño "poro de fusión" revestido de proteína (fig. 8-27, *b*) que rápidamente se dilata para formar una abertura para descarga. Cualquiera que sea el mecanismo de fusión de la membrana, cuando una vesícula citoplásmica se fusiona con la membrana plasmática, la superficie interna de la membrana vesicular entra a formar parte de la superficie externa de la membrana plasmática, en tanto que la superficie externa de la membrana vesicular formará parte de la superficie interna de la membrana plasmática (fig. 8-10).

8-5 Lisosomas

Los lisosomas actúan como organelos digestivos de la célula. Dentro de un lisosoma típico se encuentra confinado un grupo de casi 50 enzimas hidrolíticas diferentes (cuadro 8-1) sintetizadas en el RE rugoso y enviadas a esos organelos. En conjunto, las enzimas lisosómicas son capaces de

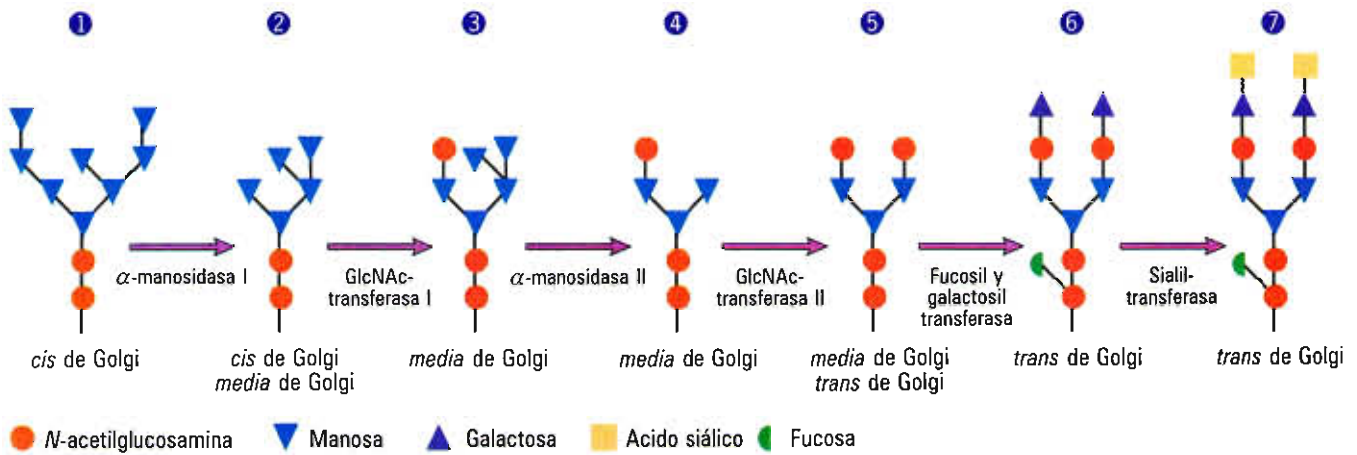
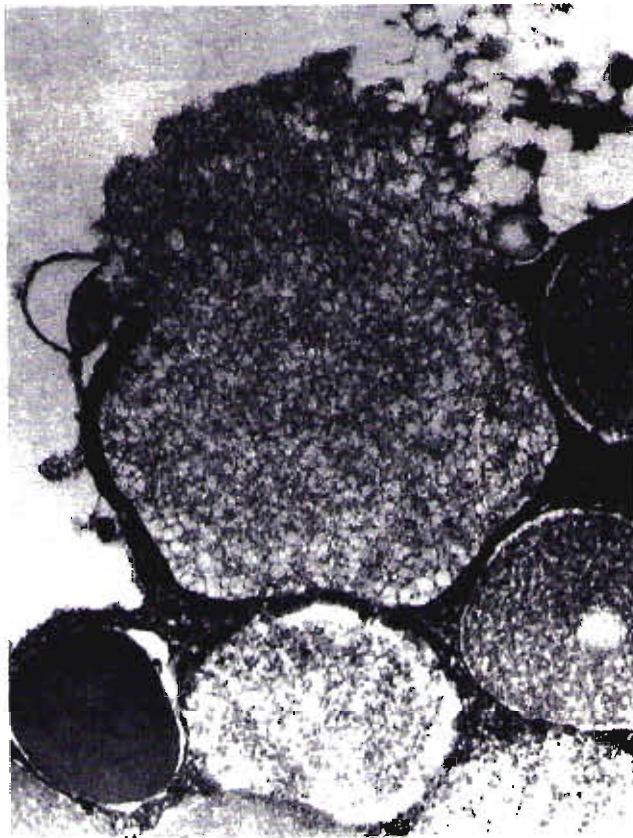
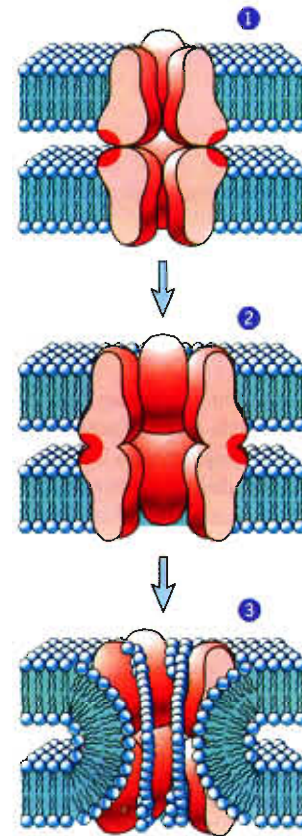


FIGURA 8-26. Etapas en la glucosilación de oligosacáridos de mamífero N enlazados en el complejo de Golgi. Luego de eliminar los tres residuos de glucosa, a continuación se quitan varios residuos manosa, en tanto que algunos azúcares (*N*-acetilglucosamina, galactosa, fucosa y ácido siálico) se añaden al oligosacárido mediante la acción de glucosiltransferasas específicas. En la luz de las cisternas de Golgi y los dominios luminales de las proteínas integrales de las membranas de Golgi se añaden cadenas similares de azúcares a ambas proteínas solubles.



(a)



(b)

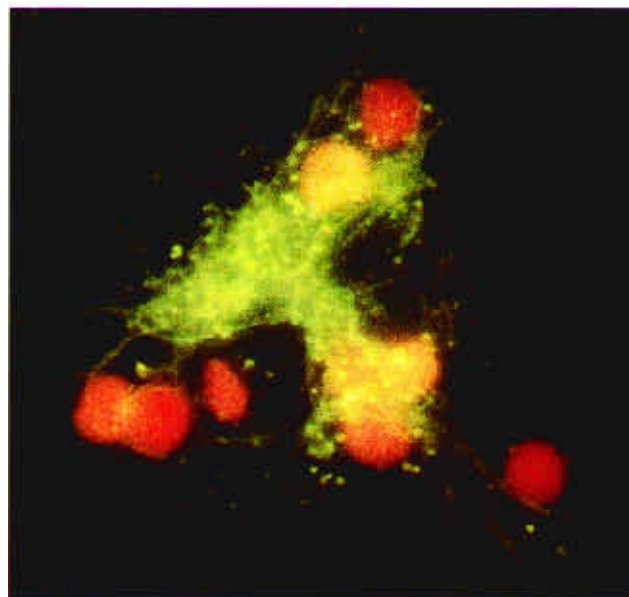
FIGURA 8-27. Exocitosis. a) Micrografía electrónica que muestra un gránulo secretorio luego de concluir la fusión con la membrana. b) Modelo de un poro de fusión formado durante la exocitosis por interacción de una proteína integral multimérica de la vesícula y la membrana plasmática. 1) Las proteínas de las dos membranas entran en contacto; 2) las proteínas forman un poro cerrado que abraza las dos bicapas, y 3) el poro se dilata conforme las moléculas de lípido difunden a lo largo de las superficies hidrofobas dispuestas entre las subunidades de fusión de los poros. (a: Cortesía de Susan Jo Burwen.)

CUADRO 8-1. Muestra de enzimas lisosómicas

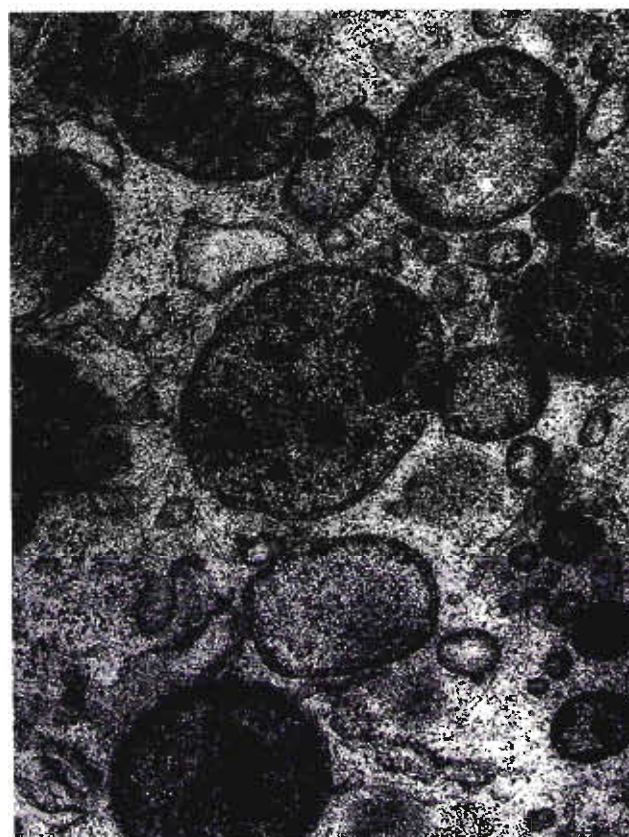
Enzima	Sustrato
Fosfatasa	
fosfatasa ácida	fosfomonoésteres
fosfodiesterasa ácida	fosfodiésteres
Nucleasas	
ribonucleasa ácida	RNA
desoxirribonucleasa ácida	DNA
Proteasas	
catepsina	proteínas
colagenasa	colágena
Enzimas que hidrolizan GAG	
iduronato sulfatasa	dermatansulfato
β -galactosidasa	queratansulfato
heparan N-sulfatasa	heparansulfato
α -N-acetilglucosaminidasa	heparansulfato
Polisacaridasas y oligosacaridasas	
α -glucosidasa	glucógeno
fucosidasa	fucosil oligosacáridos
α -manosidasa	manosil oligosacáridos
sialidasa	sialil oligosacáridos
Enzimas que hidrolizan esfingolípidos	
ceramidasa	ceramida
glucocerebrosidasa	glucosilceramida
β -hexosaminidasa	gangliósido GM ₂
arilsulfatasa A	galactosilsulfátido
Enzimas que hidrolizan lípidos	
lipasa ácida	triacilglicerolos
fosfolipasa	fosfolípidos

hidrolizar prácticamente cualquier tipo de macromolécula biológica para convertirla en productos de bajo peso molecular que puedan ser transportados a través de la membrana lisosómica al interior del citoplasma. Las enzimas de un lisosoma comparten una propiedad importante: todas tienen actividad óptima a pH ácido: son **hidrolasas ácidas**. El pH de estas enzimas se correlaciona con el pH bajo del compartimiento lisosómico, que es alrededor de 4.6. La elevada concentración interna de protones se mantiene me-

diante un transportador de protones (una H⁺-ATPasa) presente en la membrana que limita al organelo. Las membranas lisosómicas contienen dos grupos de proteínas ácidas integrales altamente glucosiladas llamadas Igp-A y Igp-B,



(a)

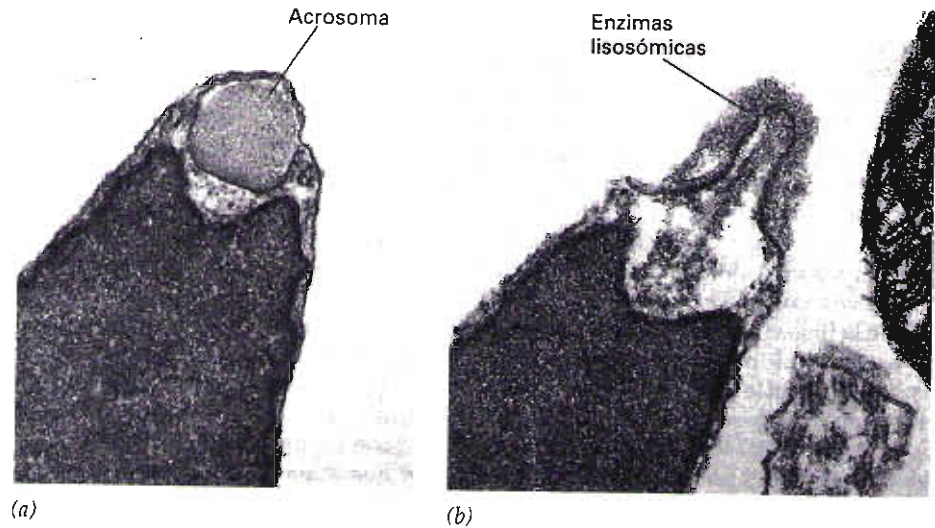


(b)

0.3 μ m

FIGURA 8-28. Lisosomas. a) Micrografía de un macrófago de médula ósea cultivado cuyos lisosomas contienen materiales ingeridos y teñidos con el colorante fluorescente amarillo lucifer. Los lisosomas de estas células inicialmente son tubulares e interconectados para formar una red reticular como la que se observa en la fotografía. Los lisosomas muestran una conformación más vesicular luego de participar en la fagocitosis. b) Porción de una célula de Kupffer del hígado (fagocitaria) que muestra cuando menos 10 lisosomas de tamaño muy variable. (a: Según Philip E. Knapp y Joel A. Swanson, *J. Cell Sci.* 95:433, 1990; con permiso de The Company of Biologists; b: según Hans Glaumann y cols. *J. Cell Biol.* 67:887, 1975, con permiso de Rockefeller University Press.)

FIGURA 8-29. Reacción acrosómica.
 a) El acrosoma del espermatozoide del erizo marino se sitúa en el extremo anterior, justo frente al núcleo. b) Cuando la membrana plasmática del espermatozoide entra en contacto con los materiales que rodean al óvulo ocurre una reacción que libera enzimas lisosómicas almacenadas en el acrosoma, que digieren un trayecto que conduce hacia la superficie del huevo. (Cortesía de Glen L. Decker, D.B. Joseph y William J. Lennarz.)



cuya función puede ser proteger a la membrana contra el ataque de las enzimas que encierra.

Aunque los lisosomas alojan un grupo conocido de enzimas, en las micrografías electrónicas su apariencia no es distintiva, ni siquiera uniforme. Por ejemplo, el tamaño

de los lisosomas oscila desde estructuras relativamente grandes (mayores de $1\ \mu\text{m}$ de diámetro) hasta vesículas muy pequeñas (25 a 50 nm de diámetro). La variación en la morfología lisosómica es más evidente en los macrófagos, células especializadas en ingerir partículas extrañas mediante un proceso de fagocitosis, que se estudia a profundidad en la sección 8-7. Cuando se diferencian macrófagos en cultivo, sus lisosomas inicialmente son organelos tubulares interconectados que forman una red reticular (fig. 8-28, a). Una vez que el macrófago cultivado comienza a fagocitar materiales, sus lisosomas se transforman en vesículas más típicas. La figura 8-28, b, muestra una pequeña porción de un célula de Kupffer, una célula fagocitaria del hígado encargada de ingerir eritrocitos envejecidos. Los lisosomas mostrados en la figura 8-28, b, tienen forma irregular y densidad electrónica variable, lo que ilustra la dificultad para identificar estos organelos con base sólo en su morfología. De ordinario, para identificar un organelo como lisosoma hay que demostrar la presencia de la enzima fosfatasa ácida (fig. 8-30). Esto se efectúa por métodos citoquímicos incubando cortes de tejido con un sustrato adecuado para la enzima en presencia de una sal soluble de plomo, como el citrato de plomo. Cuando la fosfatasa ácida separa el fosfato inorgánico del sustrato se forma un precipitado insoluble de fosfato de plomo en el sitio, el cual puede identificarse directamente en el microscopio electrónico. Aunque es evidente que los lisosomas aparecen estáticos en una micrografía electrónica, se ha demostrado que son organelos dinámicos capaces de efectuar fusión y fisión con rapidez.

La presencia dentro de una célula de esta verdadera bolsa de enzimas destructoras sugiere algunas posibles funciones. La función mejor estudiada de los lisosomas es el desdoblamiento de materiales que llegan a las células procedentes del ambiente extracelular. Muchos organismos unicelulares ingieren partículas nutrientes que son desensambladas en el lisosoma por las enzimas. Los nutrientes pasan al interior del citoplasma a través de la membrana lisosómica. En mamíferos, las células fagocitarias, como los macrófagos y los neutrófilos, funcionan como carroñeros

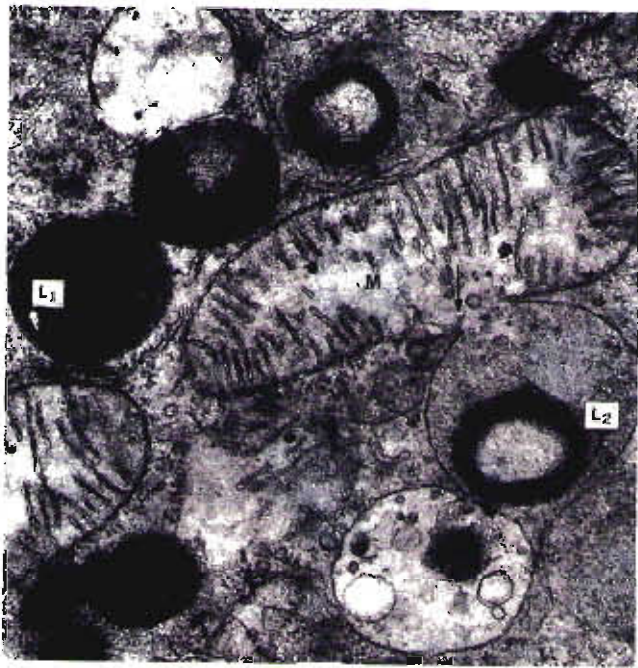


FIGURA 8-30. Lisosomas y autofagia. Micrografía electrónica de la célula de una porción de túbulo renal de ratón que muestra numerosos lisosomas. La presencia de enzimas lisosómicas en estos organelos se demuestra por técnicas citoquímicas mediante la precipitación de fosfato de plomo procedente del fosfato inorgánico liberado por actividad de la fosfatasa ácida (como en L_1). El lisosoma marcado L_2 se fusiona con una mitocondria enlazada a la membrana para formar una vacuola autofágica. (Según Vivianne Maggi, en E.E. Bittar, ed., *Cell Biology in Medicine*, Wiley, 1973.)

que ingieren desperdicios o microorganismos potencialmente peligrosos. En general, estos materiales se inactivan al pH bajo del lisosoma y luego son digeridos por las enzimas. Se estima que un macrófago participa intensamente en la fagocitosis y puede contener más de mil lisosomas.

No todas las bacterias ingeridas por células fagocitarias son destruidas. Algunas especies, como *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis, penetran al citoplasma de un macrófago mediante fagocitosis, pero la vesícula (fagosoma) donde quedan encerrados no se fusiona con un lisosoma. De alguna manera, el microorganismo inhibe la fusión que conduciría a su destrucción, y en lugar de eso se multiplica dentro de la célula. En contraste, la bacteria causante de la fiebre Q, *Coxiella burnetii*, queda incluida en un fagosoma que se funde con un lisosoma, pero ni el ambiente ácido ni las enzimas del lisosoma son capaces de destruir al patógeno. Un tercer paso es el que toma *Listeria monocytogenes*, bacteria capaz de causar meningitis. Este microorganismo produce una fosfolipasa que destruye la integridad de la membrana lisosómica y permite que la bacteria escape hacia el interior del citoplasma de la célula.

Durante la fertilización se observa una actividad lisosómica poco habitual. La cabeza del espermatozoide con-

tiene un paquete de enzimas lisosómicas denominado *acrosoma*. Cuando el espermatozoide alcanza la vecindad de un óvulo, la membrana que rodea el acrosoma se fusiona con la membrana plasmática suprayacente y libera las enzimas lisosómicas almacenadas (fig. 8-29). Las enzimas digieren una vía a través de la cubierta externa del óvulo y dejan un "agujero" por el cual avanza el espermatozoide, que entonces puede alcanzar la membrana plasmática del óvulo.

Los lisosomas no sólo están implicados en la destrucción de materiales que penetran a la célula desde el medio externo. También desempeñan un papel clave en el **recambio** del organelo, o sea, la destrucción y sustitución de organelos. Durante este proceso, denominado **autofagia**, un organelo como la mitocondria, mostrado en la figura 8-30, se rodea de una membrana donada por el retículo endoplásmico. A continuación, la membrana que rodea al organelo se fusiona con un lisosoma formando una *vacuola autofágica*. Cuando se examina una micrografía electrónica no es raro observar una mitocondria u otro organelo atrapado en una vacuola autofágica. Se calcula que en una célula hepática de mamífero, una mitocondria sufre autofagia cada 10 minutos, aproximadamente. El número de vacuolas autofágicas observadas en una célula puede variar según el estado fi-

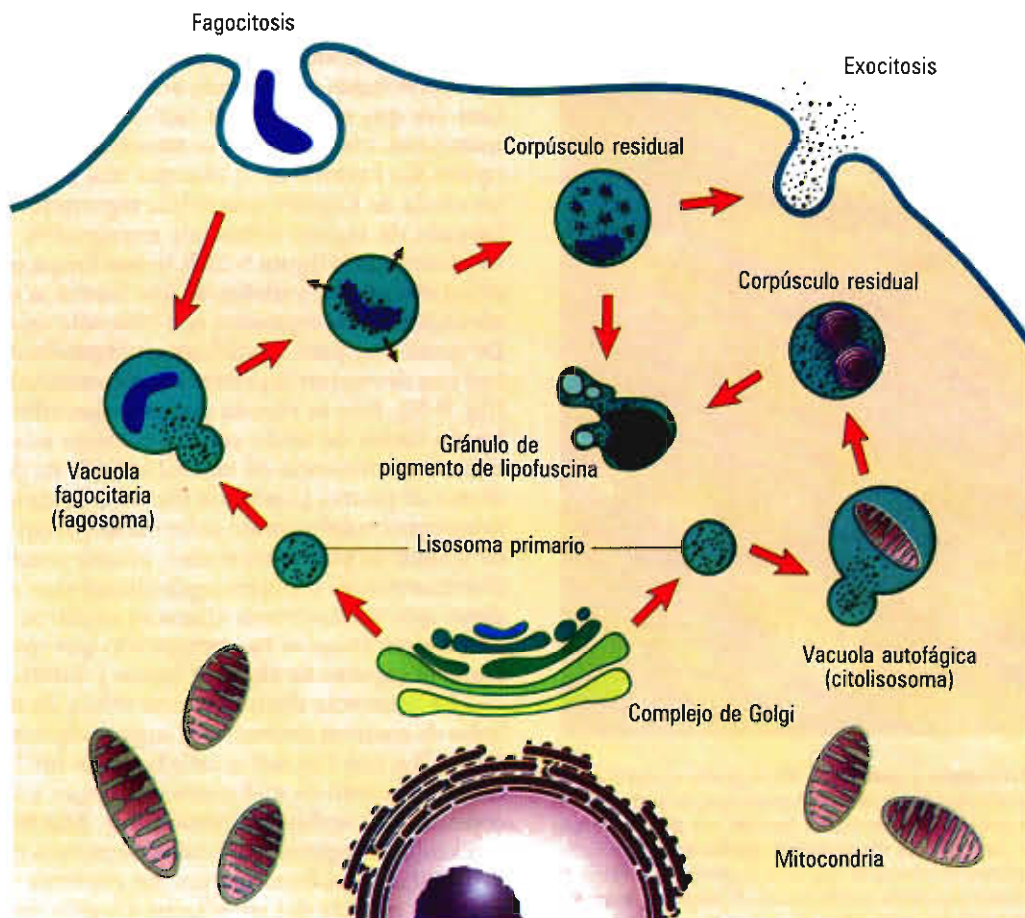


FIGURA 8-31. Resumen de las vías del sistema lisosómico.

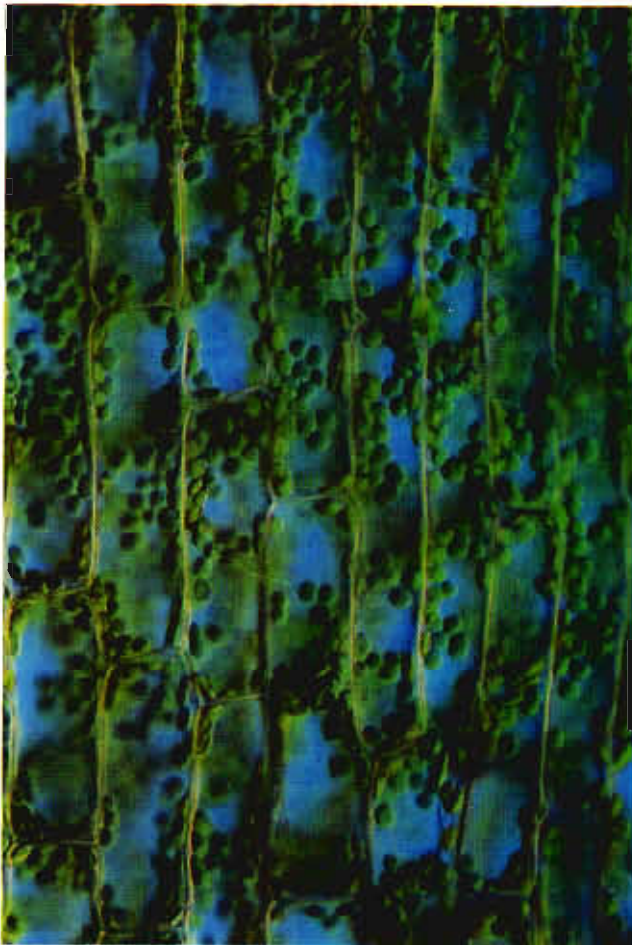
siológico de la misma. Si se priva a una célula de nutrientes se observa un marcado incremento de la autofagia. En estas condiciones, la autofagia suministra a la célula la energía para mantenerse viva mediante la canibalización de sus propios organelos.

El papel de los lisosomas en dos funciones principales, fagocitosis y autofagia, se resume en la figura 8-31; el papel de estos organelos digestivos en una tercera actividad (endocitosis) se analiza en la página 313. Se ha demostrado que los lisosomas primarios, o sea, lisosomas que aún no tienen funciones en la digestión celular, se fusionan con vesículas fagocitarias que contienen materiales extraños, como bacterias, o con vesículas autofágicas que contienen organelos celulares, como mitocondrias. En cualquier caso, una vez concluido el proceso digestivo, el organelo se denomina *corpúsculo residual*. Según el tipo de célula, el contenido del corpúsculo residual puede eliminarse de la célula por exocitosis, o quedar retenido indefinidamente en el citoplasma como *gránulo de lipofusina*. Los gránulos de lipofusina aumentan de número conforme un individuo envejece; su acumulación es particularmente notable en células de vida prolongada, como las neuronas, donde estos gránulos se consideran una característica principal del proceso de

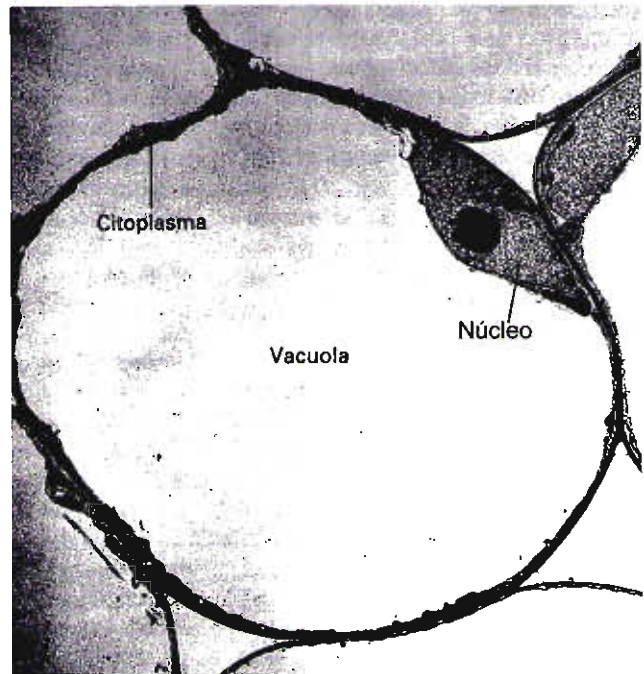
envejecimiento. El papel de los lisosomas en diversas enfermedades se analiza en *La perspectiva humana*, en este capítulo.

8-6 Vacuolas de células vegetales

Más de 90% del volumen de muchas células vegetales se encuentra ocupado por una sola **vacuola** llena de líquido y rodeada por una membrana (fig. 8-32). Aunque de estructura sencilla, las vacuolas de las plantas efectúan una amplia gama de funciones esenciales. Sirven como almacén transitorio para muchos solutos de la célula y de macromoléculas, incluyendo iones, azúcares, aminoácidos, proteínas y polisacáridos. Las vacuolas también pueden almacenar algunos compuestos tóxicos. Estos compuestos (como los glucósidos que contienen cianuro y los glucosinolatos) forman parte de un arsenal químico de armas liberadas cuando la célula es lesionada por un herbívoro o por hongos. Otros compuestos tóxicos son simplemente subproductos de reacciones metabólicas; puesto que las plantas carecen de sistemas de tipo excretorio, como los observados en animales, utilizan sus vacuolas como medio para elimi-



(a)



(b)

FIGURA 8-32. Vacuolas de células vegetales. a) Cada una de las células cilíndricas de las hojas de la planta acuática *Elodea* contiene una gran vacuola central rodeada por una capa de citoplasma que contiene los cloroplastos visibles en la micrografía. b) Micrografía por transmisión electrónica de una célula cortical de frijol de soja que muestra la gran vacuola central y la delgada capa de citoplasma que la rodea. (a: Según M.I. Walker/Photo Researchers; b: según M.F. Brown/Visuals Unlimited.)

LA PERSPECTIVA HUMANA

Enfermedades producidas por defectos de la función lisosómica

Si consideramos que las enzimas hidrolíticas de un lisosoma pueden digerir todo el contenido de una célula, no es sorprendente que los trastornos de la función lisosómica tengan un profundo efecto sobre la salud humana. Por ejemplo, la enfermedad de los mineros conocida como *silicosis* se debe a la captación de fibras de sílice por las células fagocitarias de los pulmones. Las fibras quedan encerradas en los lisosomas, pero no pueden digerirse; en vez de esto, provocan fugas en la membrana lisosómica, derrame del contenido de enzimas digestivas dentro de la célula y daño al tejido pulmonar. Ocurre algo similar cuando las células carroñeras captan fibras de asbesto y ocasionan la enfermedad llamada *asbestosis*. Ambos padecimientos pueden ser debilitantes e incluso causar la muerte. Ciertos tipos de enfermedades inflamatorias, como la artritis reumatoide, se deben en parte a la liberación de enzimas lisosómicas procedentes de células inmunológicas en el espacio extracelular, dañando los materiales intraarticulares.

La comprensión de los mecanismos para enviar proteínas hacia organelos particulares se inició con el descubrimiento de que los residuos manosa 6-fosfato de las enzimas lisosómicas actúan como "dirección postal" para entregar proteínas a los lisosomas. El descubrimiento de la "dirección" del lisosoma ocurrió en estudios de pacientes con una rara enfermedad hereditaria conocida como *enfermedad de la célula I*, en la cual muchas células del cuerpo contienen lisosomas inundados de materiales no degradados. Los materiales se acumulan en los lisosomas de estos pacientes por la falta de enzimas hidrolíticas. Cuando se estudiaron cultivos de fibroblastos de estos pacientes se observó que las enzimas lisosómicas se sintetizan en concentración

normal, pero que en vez de entrar a los lisosomas de la célula son secretadas al medio externo. Estudios subsecuentes revelaron que las enzimas secretadas carecen de residuos manosa fosfato presentes en las enzimas correspondientes de las células de individuos normales. Pronto se demostró que el defecto de la célula I era una deficiencia de la enzima (*N*-acetilglucosamina fosfotransferasa) necesaria para la fosforilación de la manosa (fig. 8-24).

En 1965, W.G. Hers, de la Universidad de Louvain, en Bélgica, postuló una hipótesis para explicar cómo la ausencia de una enzima lisosómica aparentemente sin importancia, la α -glucosidasa, podía provocar la aparición de una enfermedad hereditaria mortal conocida como enfermedad de Pompe. Hers sugirió que en ausencia de α -glucosidasa el glucógeno no digerido se acumula en los lisosomas causando inflamación de esos organelos y daño irreversible a células y tejidos. Enfermedades de este tipo, caracterizadas por la deficiencia de una enzima lisosómica y acumulación del correspondiente sustrato no desdoblado (fig. PH 8-1), se denominan **enfermedades por almacenamiento lisosómico**; hasta ahora se han descrito más de 30 (cuadro PH 8-1). Los síntomas de las enfermedades por almacenamiento lisosómico van desde enfermedades muy graves hasta padecimientos difíciles de determinar, según el grado de actividad de la enzima a pesar de la presencia de una mutación genética. La mayor parte de las enfermedades por almacenamiento lisosómico son hereditarias autosómicas recesivas y por lo tanto los individuos afectados heredan el gen defectuoso de ambos progenitores. Dos de estas enfermedades (la de Fabry y la de Hunter) son causadas por genes presentes en el cromosoma X y son mucho más frecuentes en los hijos

5 μ m

Figura PH 8-1. Trastornos del almacenamiento lisosómico. Micrografía electrónica de un corte transversal de una porción de glándula sudorípara en un paciente con enfermedad de Hunter, padecimiento por almacenamiento lisosómico caracterizado por incapacidad para descomponer glucosaminoglicanos. De los tres tipos de células mostradas, mioepiteliales (ME), células claras (CC) y células oscuras (DC), las dos últimas se caracterizan por la presencia de numerosas vacuolas ausentes en las mismas células de un individuo normal. En estas vacuolas se observan enzimas lisosómicas teñidas y glucosaminoglicanos, lo que indica acumulación de glucosaminoglicanos no digeridos en esos lisosomas. (Cortesía de S.S. Spicer.)

varones, quienes heredan el alelo mutante de la madre.

Entre las enfermedades por almacenamiento lisosómico mejor estudiadas se encuentra la enfermedad de Tay-Sachs, resultante de una deficiencia de la enzima β -N-hexosaminidasa A, en-

CUADRO PH 8-1. Enfermedades por almacenamiento de esfingolípidos

Enfermedad	Deficiencia enzimática	Principal sustancia almacenada	Consecuencias
Gangliosidosis G _{M1}	β -galactosidasa G _{M1}	Gangliósido G _{M1}	Retraso mental, hepatomegalia, afección del esqueleto, muerte cerca de los dos años de edad
Enfermedad Tay-Sachs	Hexosaminidasa A	Gangliósido G _{M2}	Retraso mental, ceguera, muerte cerca de los tres años de edad
Enfermedad de Fabry	α -galactosidasa A	Trihexosilceramida	Erupción cutánea, insuficiencia renal, dolor en las extremidades inferiores
Enfermedad de Sandhoff	Hexosaminidasas A y B	Gangliósido G _{M2} y globósido	Similar a la enfermedad Tay-Sachs, pero de evolución más rápida
Enfermedad de Gaucher	Glucocerebrósido	Glucocerebrósido	Hepatomegalia y esplenomegalia, erosión de huesos largos, retraso mental sólo en la forma infantil
Enfermedad Niemann-Pick	Esfingomielinasa	Esfingomielina	Hepatomegalia y esplenomegalia, retraso mental
Lipogranulomatosis de Farber	Ceramidasa	Ceramida	Dolor y deformación progresiva de las articulaciones, nódulos cutáneos, muerte en los primeros pocos años
Enfermedad de Krabbe	Galactocerebrosidasa	Galactocerebrósido	Pérdida de la mielina, retraso mental, muerte a la edad de dos años
Sulfatidolipidosis	Arilsulfatasa A	Sulfátido	Retraso mental, muerte en el primer decenio de vida

zima requerida para desdoblar el gangliósido G_{M2} (fig. 4-6), componente común de la membrana de células cerebrales. En su forma más grave, que ataca durante la infancia, la enfermedad se caracteriza por retraso mental y motor progresivo, y también por anomalías esqueléticas, cardíacas y respiratorias. La enfermedad es muy rara en la población general, pero alcanza una tasa mayor de 1 en 3 600 nacimientos entre descendientes de judíos de Europa oriental. En años recientes, la ocurrencia de la enfermedad descendió de manera espectacular en esta población étnica como consecuencia de la identificación de portadores, consejo genético a progenitores en riesgo, y diagnóstico prenatal por amniocentesis. En realidad, todas las enfermedades conocidas por almacenamiento lisosómico

se pueden diagnosticar antes del nacimiento.

En los últimos años han mejorado mucho las perspectivas del tratamiento de las enfermedades por almacenamiento lisosómico con la demostración de que los síntomas de la enfermedad de Gaucher, causada por deficiencia de la enzima lisosómica glucocerebrosidasa, se pueden aliviar parcialmente sustituyendo la enzima. Los lactantes con enfermedad de Gaucher acumulan grandes cantidades de glucocerebrósidos en los lisosomas de sus macrófagos. Los intentos iniciales para corregir la enfermedad inyectando en la corriente sanguínea una solución de la enzima humana normal no tuvieron éxito debido a que la enzima era captada por las células hepáticas, no afectadas gravemente por la enfermedad.

Para orientar específicamente a los macrófagos, la glucocerebrosidasa purificada se trató con enzimas que eliminan los azúcares terminales de las cadenas de oligosacáridos al exponer los residuos manosa subyacentes. Luego se inyectó en la corriente sanguínea esta enzima modificada, que fue reconocida por los receptores situados en la superficie de los macrófagos y captada con rapidez por endocitosis mediada por receptor (estudiada en la página 309). Puesto que los lisosomas son el objetivo natural de los materiales llevados al interior del macrófago por endocitosis, las enzimas fueron entregadas con eficiencia en los sitios precisos de la célula donde se manifestaba la deficiencia. Todavía no se sabe si esta técnica se aplicará extensamente.

nar estos subproductos del resto de la célula. Algunos de estos compuestos, como la digital, han demostrado tener un valor clínico importante.

En la página 000, se hizo notar que las células vegetales conservan una presión de líquido elevada (turgencia) que empuja la pared celular hacia afuera y conserva la forma de la célula. La presión por turgencia es generada por la elevada presión osmótica de la vacuola. La membrana que rodea la vacuola, denominada **tonoplasto**, contiene algunos siste-

mas de transporte activo que bombean iones al interior del compartimiento de la vacuola hasta alcanzar una concentración mucho más alta que la del líquido extracelular. Debido a la elevada concentración iónica, el agua penetra a la vacuola por ósmosis. La presión ejercida por turgencia en la vacuola no sólo suministra apoyo mecánico a los tejidos blandos de una planta, sino también proporciona la fuerza necesaria para estirar la pared celular y permitir que las células vegetales aumenten de volumen.

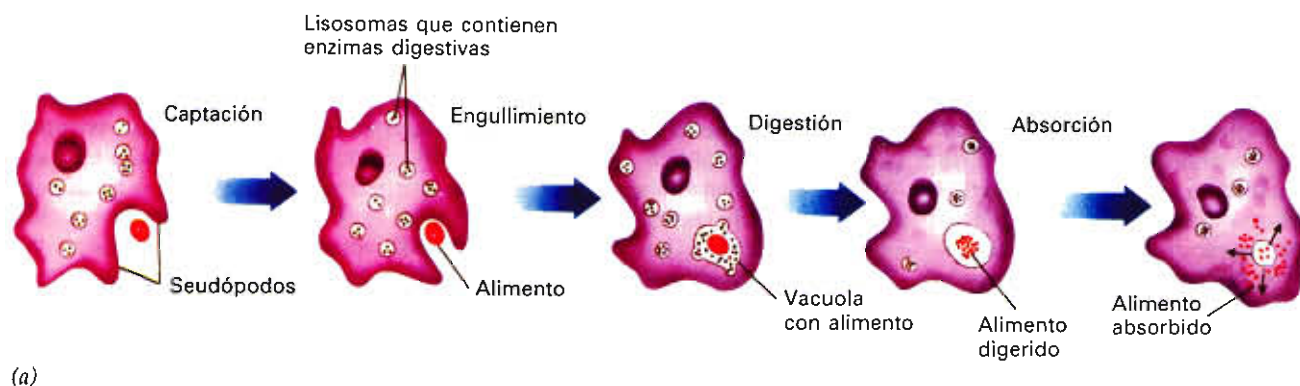
Las vacuolas de las plantas también son sitios de digestión intracelular no muy diferentes de los lisosomas de una célula animal. En realidad, las vacuolas de las plantas poseen algunas hidrolasas ácidas iguales a las que se encuentran en los lisosomas; el pH de la vacuola se mantiene a un valor bajo mediante una H^+ -ATPasa dentro del tonoplasto que bombea protones al interior del líquido vacuolar. Otra característica que comparten las vacuolas vegetales con los lisosomas es su participación como punto final en la vía biosintética de la célula. Igual que las proteínas del lisosoma, muchas proteínas de una vacuola vegetal se sintetizan en ribosomas enlazados a membranas del RER, son transportadas a través del complejo de Golgi y clasificadas en la cara *trans* de dicho complejo antes de ser enviadas hacia la vacuola. En algunas células, como las del parénquima del almacén de semillas en desarrollo, más de 50% de las proteínas recién sintetizadas son enviadas a la vacuola para almacenamiento.

8-7 Captación celular de partículas y macromoléculas

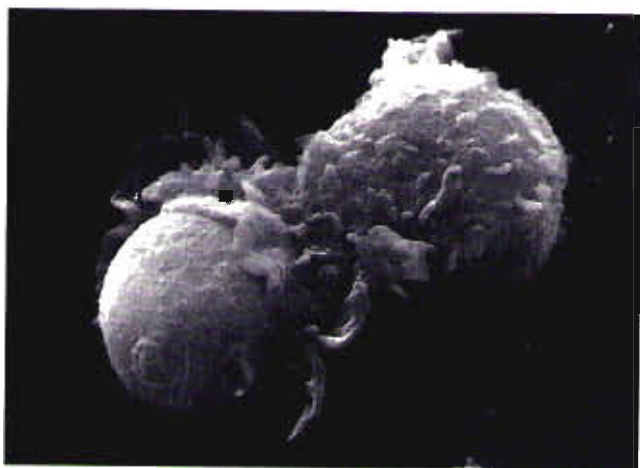
En un capítulo previo se consideró el movimiento de solutos de bajo peso molecular directamente a través de la membrana plasmática, pero ¿cómo pueden las células captar ma-

teriales demasiado grandes para penetrar su membrana independientemente de sus propiedades de permeabilidad? Para satisfacer esta necesidad evolucionaron mecanismos que captan materiales del medio extracelular dentro de vesículas derivadas de pliegues, o invaginaciones, de la membrana plasmática. La captación de materiales extracelulares en vesículas citoplásmicas se divide en dos categorías separadas, fagocitosis y endocitosis, que ocurren por mecanismos diferentes. La **fagocitosis** es la captación de partículas materiales y la **endocitosis** es la captación de líquidos, solutos disueltos y macromoléculas suspendidas.³ Las vesículas formadas por fagocitosis son típicamente casi 10 veces más grandes (1 a 2 μm de diámetro) en comparación con las formadas por endocitosis (0.1 a 0.2 μm de diámetro).

³ En años recientes, la terminología sufrió cambios en este campo. En 1963, Christian de Duve introdujo el término endocitosis para incluir dos tipos de actividades, la ingestión de partículas (fagocitosis) y la captación de líquidos y solutos (pinocitosis). Puesto que últimamente se demostró con claridad que fagocitosis y pinocitosis son actividades fundamentalmente diferentes, el término pinocitosis cayó en desuso (excepto para describir la captación de líquido por protistas). En la actualidad, endocitosis se usa comúnmente para describir la captación tanto de líquidos como de moléculas disueltas o suspendidas, y debe distinguirse de la fagocitosis.



(a)



(b)

1.5 μm

FIGURA 8-33. Fagocitosis. a) Diagrama de las etapas de engullimiento, digestión y absorción de materiales llevados al interior de una ameba por fagocitosis. b) Se ilustra el proceso de engullimiento efectuado por un leucocito polimorfonuclear que ingiere una partícula de levadura. (b: Según J. Boyles y Dorothy F. Bainton, *Cell* 24:906, 1981; con permiso de Cell Press.)

Fagocitosis

La fagocitosis ("células que comen") es ejecutada extensamente por unos pocos tipos de células especializadas en captar partículas materiales del ambiente y entregarlas al lisosoma. Los organismos heterótrofos unicelulares, como amibas y ciliados, se mantienen vivos atrapando partículas nutrientes y organismos más pequeños, y aprisionándolos en pliegues de la membrana plasmática. Los pliegues se fusionan para formar una vacuola (o *fagosoma*) que se desprende de la membrana plasmática (fig 8-33, *a*). El fagosoma se fusiona con un lisosoma y así el material se digiere en el interior de la célula.

En casi todos los animales evolutivamente desarrollados, la fagocitosis es un mecanismo protector y no una manera de alimentarse. Los mamíferos poseen varias células fagocitarias, incluyendo macrófagos y neutrófilos, cuya función es vagar por la sangre y los tejidos fagocitando organismos invasores, células dañadas, eritrocitos envejecidos y desperdicios. La actividad contráctil de microfilamentos subyacentes a la membrana plasmática que contiene actina controla el engullimiento de partículas materiales por fagocitosis. El proceso de engullimiento de partículas se ilustra en la figura 8-33, *b*. Los pasos en la digestión del material engullido se muestran en la figura 8-31.

Endocitosis

La endocitosis se puede dividir de manera muy general en dos categorías: endocitosis a granel y endocitosis mediada por receptores. La **endocitosis a granel** consiste en la captación de líquidos extracelulares que la superficie de la membrana no reconoce. Cualquier molécula, grande o pequeña, incluida en el líquido también penetra a la célula. Esta endocitosis se puede visualizar añadiendo sustancias al medio de cultivo, como el colorante amarillo luciferina o la enzima peroxidasa de rábano silvestre, que son captadas por las células de manera inespecífica. La endocitosis a granel puede ocurrir de manera continua en muchos tipos de células y su función primaria puede centrarse en la recuperación de membrana plasmática luego de periodos de secreción o durante el ingreso de líquido extracelular. La **endocitosis mediada por receptores (EMR)** consiste en la captación de macromoléculas extracelulares específicas (ligandos) luego de unirse a receptores en la superficie exterior de la membrana plasmática. La endocitosis mediada por receptores se estudia más adelante y en *La vía experimental*, al final de este capítulo.

Tanto la endocitosis a granel como la mediada por receptores pueden ocurrir a una tasa notablemente rápida: en un periodo tan breve como 15 minutos puede entrar a la célula hasta la mitad de la superficie de la membrana. A pesar del rápido movimiento de la membrana plasmática hacia adentro, la superficie celular no se arruga ni hay necesidad inmediata de sintetizar nuevos componentes de la membrana; simplemente se recicla la membrana en una y otra dirección en la superficie interior de la célula, de modo que se añade membrana a la superficie tan rápidamente como se elimina.

Endosomas

El material captado por endocitosis de ordinario se descarga en una red de túbulos y vesículas que en conjunto se conocen como **endosomas**. Los endosomas además se dividen en dos compartimientos, los **endosomas tempranos**, típicamente localizados cerca de la región periférica de la célula, y los **endosomas tardíos**, que de ordinario se localizan en alguna parte más interior de la célula, más cerca del núcleo (fig. 8-34). Los endosomas tempranos y tardíos se pueden distinguir entre sí según sus propiedades, como su densidad flotante (que permite aislarlos en fracciones diferentes en un gradiente de densidad), pH y contenido enzimático.

Los materiales captados por endocitosis en la superficie de la célula primero se transportan a los compartimientos endosómicos tempranos, que se cree que actúan como una área de clasificación. Algunos materiales que penetran a los endosomas tempranos son enviados a los endosomas tardíos (fig. 8-35), otros retornan a la membrana plasmática e incluso algunas sustancias pueden ser enviadas hacia el complejo de Golgi. Se cree que los endosomas tardíos reciben enzimas lisosómicas sintetizadas en el RER y clasificadas en la RTG, además de recibir el material de los endosomas tempranos. Los endosomas tardíos pueden imaginarse como un "compartimiento prelisosómico" que tiene pH ácido y una concentración baja de enzimas lisosómicas. Los materiales pasan del endosoma tardío al interior de los lisosomas, donde sufren un procesamiento adicional, según se analiza en *La vía experimental*, al final del capítulo.

Endocitosis mediada por receptor y papel de las fosillas revestidas

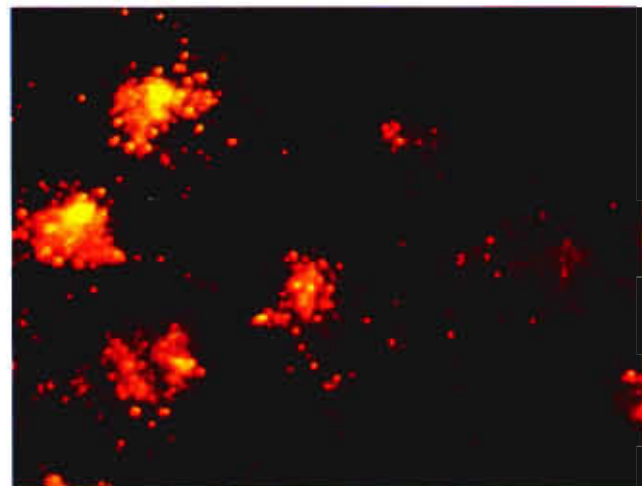
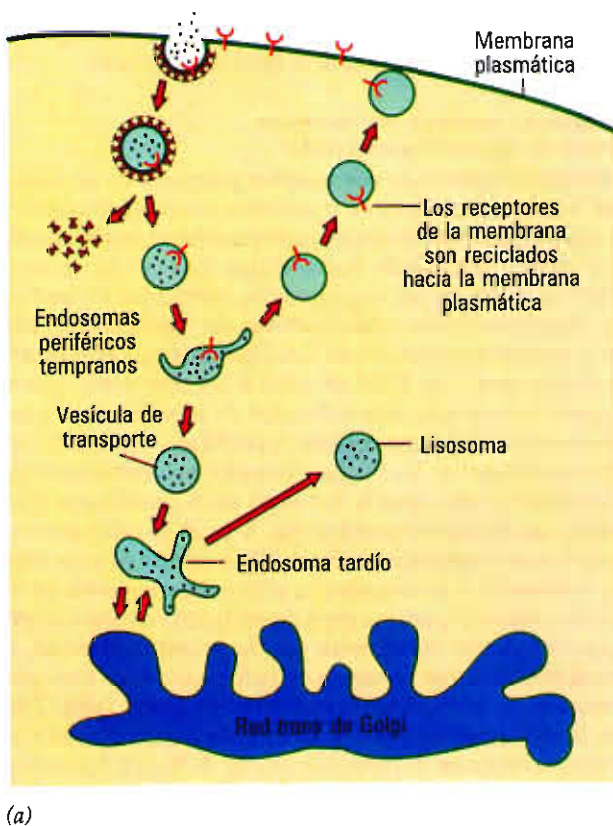
La endocitosis mediada por receptor proporciona un medio para la captación selectiva y eficiente de macromoléculas que pueden estar presentes en concentraciones relativamente bajas dentro del líquido extracelular. Las células poseen receptores para captar muchos tipos diferentes de sustancias, incluyendo hormonas, factores de crecimiento, enzimas y proteínas plasmáticas. Los ligandos que entran a la célula por medio de EMR se unen a los receptores que se agrupan en regiones especializadas de la membrana plasmática, conocidos como **fosillas revestidas**. Algunos receptores se agrupan en las fosillas revestidas en concentración equivalente a 100 veces la del resto de la membrana plasmática. Las fosillas revestidas (fig. 8-36, *a*) se reconocen en el microscopio electrónico como sitios donde la superficie está indentada y la membrana plasmática cubierta en su cara citoplásmica por una capa de material velludo electrónicamente denso constituida por la proteína **clatrina**, la misma proteína que participa en la formación de vesículas revestidas de clatrina en la red *trans* de Golgi (pág. 298). Una fosilla revestida sobre la membrana plasmática se invagina al interior del citoplasma (fig. 8-36, *b*) y forma una vesícula revestida que adelgaza su tallo para liberarse de la membrana plasmática que la cubre (fig. 8-36, *c,d*). Al examinar la estructura del recubrimiento y de las moléculas que las componen se puede tener un mejor conocimiento del proceso de formación de las vesículas revestidas.

La figura 8-37 muestra una fosilla revestida como se observa en las superficies extracelular y citoplásmica de la membrana plasmática de una célula que participa en

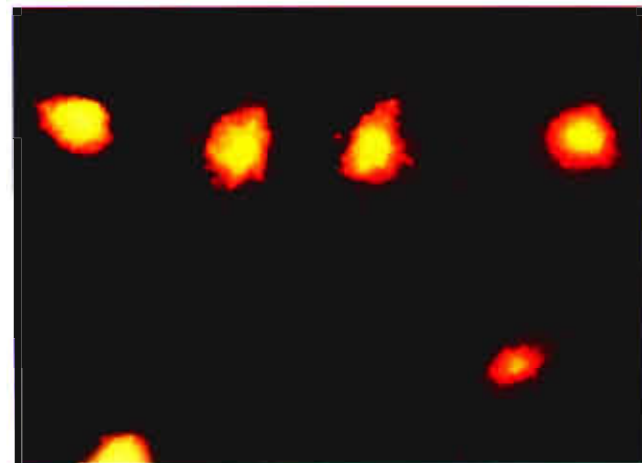
endocitosis mediada por receptor. Observada desde su superficie citoplásmica (fig. 8-37, b), se nota que la cubierta velluda contiene una red de polígonos parecida a un panal de abejas. La construcción geométrica de la cubierta se deriva de la estructura de sus bloques de construcción de clatrina. Cada molécula de clatrina se compone de tres cadenas pesadas y tres cadenas ligeras reunidas para formar un ensamblado de tres extremidades denominado *trisquelion* (fig. 8-38). Un trisquelion constituye un módulo notablemente adaptable con el cual una célula puede construir rejillas poligonales. Durante la invaginación, el enrejado relativamente plano de la fosilla revestida se incurva rodeando la vesícula en formación. La figura 8-37, c, muestra la estructura de una fosilla revestida que sufre invaginación y se aproxima a la etapa donde se desprende para formar una vesícula revestida. Una rejilla compuesta de trisqueliones es una estructura muy adecuada para sufrir el tipo de redistribución estructural requerida para transformar una rejilla plana en una estructura en forma de caja (fig. 8-39, a). En realidad, los trisqueliones purificados de clatrina se autoensamblan para formar cajas vacías similares a las encerradas en una vesícula revestida. En la figura 8-39, b, se muestra la disposición de trisqueliones de tres extremida-

des de clatrina superpuestos en la pared de una vesícula revestida.

Igual que las vesículas revestidas de clatrina formadas por gemación de la RTG (pág. 298), las vesículas revestidas formadas durante la endocitosis también contienen una capa de complejos adaptadores situada entre la rejilla de clatrina y la superficie de la membrana vesicular que enfrenta el citoplasma. Lo mismo que en las vesículas revestidas de la RTG, los adaptadores son los que específicamente se unen a los receptores de la membrana plasmática (fig. 8-40). Se cree que la unión ocurre entre adaptadores y "señales específicas de endocitosis" localizadas en las colas citoplásmicas de los receptores que deben llevarse al interior. Estos enlaces aseguran que los receptores (y sus ligandos enlazados) queden incluidos dentro de la vesícula revestida en formación y

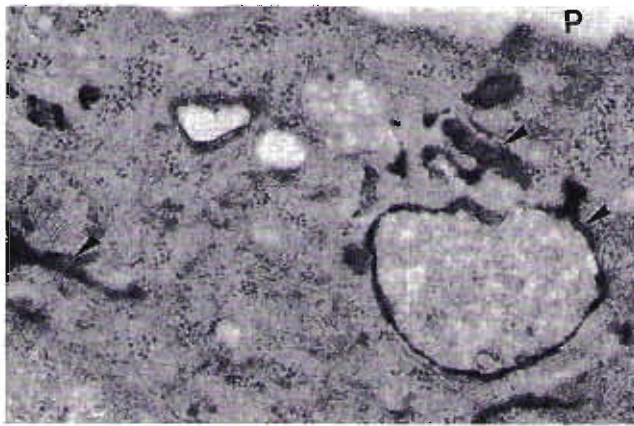


(b)

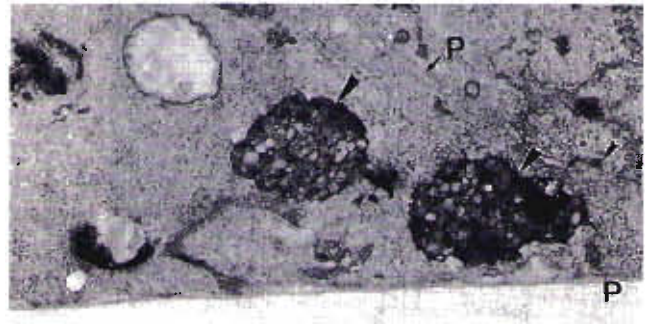


(c)

FIGURA 8-34. La vía endosómica. a) Diagrama que muestra el desplazamiento de materiales procedentes del espacio extracelular hacia los endosomas tempranos, donde se cree que tiene lugar la clasificación. Con frecuencia los receptores de membrana son enviados de regreso hacia la membrana plasmática, en tanto que los materiales dentro de la vesícula se transfieren a los endosomas tardíos y luego al lisosoma. b-c) Se incubaron células cultivadas con transferrina fluorescente marcada y una proteína que las células captan por endocitosis. b) Poco después de la endocitosis se observan los materiales marcados en endosomas tempranos, punteados, ampliamente distribuidos. c) En la etapa final, la transferrina marcada se libera en el compartimento endosómico tardío y se concentra más cerca del núcleo celular. (b-c: Cortesía de Satyajit Mayor, Kenneth W. Dunn y Fred Maxfield.)



(a)



(b)

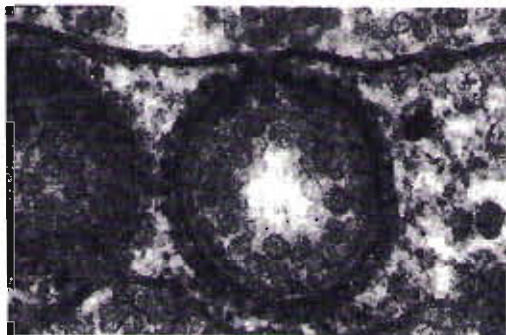
FIGURA 8-35. Demostración experimental del desplazamiento de materiales del endosoma temprano al endosoma tardío. *a)* Célula de cobayo cultivada incubada durante cinco minutos con la enzima peroxidasa de rábano, que la célula lleva a su interior por endocitosis y que puede localizarse mediante microscopia electrónica citoquímica. El producto de la reacción con la peroxidasa de rábano ingerida se observa como precipitado electrónicamente denso de forma y tamaño variables, restringido a los endosomas tempranos (flechas). *b)* Célula incubada con peroxidasa de rábano durante 25 minutos, tiempo suficiente para que la enzima ingerida se desplace a los endosomas vesiculares de mayor tamaño formados tardíamente (flechas más grandes). En estas células particulares, los endosomas tardíos de ordinario se muestran llenos de estructuras vesiculares más pequeñas (P, membrana plasmática). (Cortesía de G. Griffiths, R. Back y M. Marsh.)



(a)



(b)



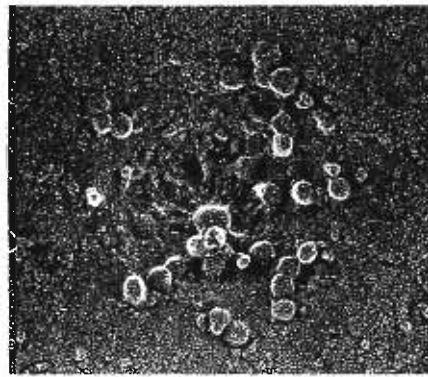
(c)



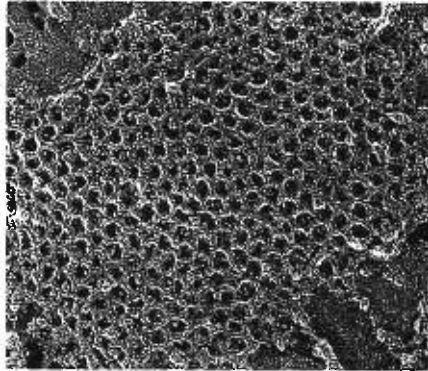
(d)

0.1 µm

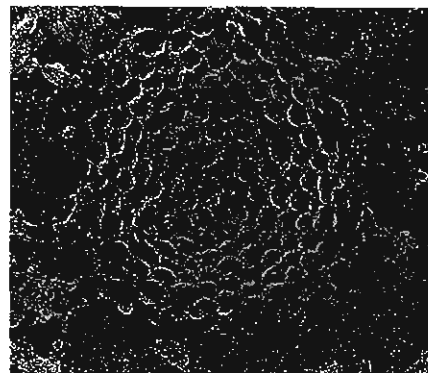
FIGURA 8-36. Endocitosis mediada por receptor. Esta secuencia de micrografías muestra las etapas de captación de lipoproteínas vitelinas por el oocito de gallina. *a)* Las proteínas que la célula lleva a su interior se concentran en la superficie externa de una región indentada de la membrana plasmática, llamada fosilla revestida. La superficie interna de la membrana plasmática de la superficie revestida está cubierta por una capa de material vellosito electrónicamente denso que contiene clatrina. *b)* La fosilla revestida se hunde para formar un pliegue de membrana plasmática todavía recubierto en su superficie interna por clatrina. *c)* La membrana plasmática a punto de separarse en forma de una vesícula que contiene proteína de yema de huevo sobre su superficie luminal y clatrina sobre su superficie citoplásmica. *d)* Vesícula revestida separada de la membrana plasmática. El siguiente paso del proceso es liberar la cubierta de clatrina. (Según M.M. Perry y A.B. Gilbert, J. Cell Science 39:257, 1979, con permiso de The Company of Biologists Ltd.)



(a)



(b)

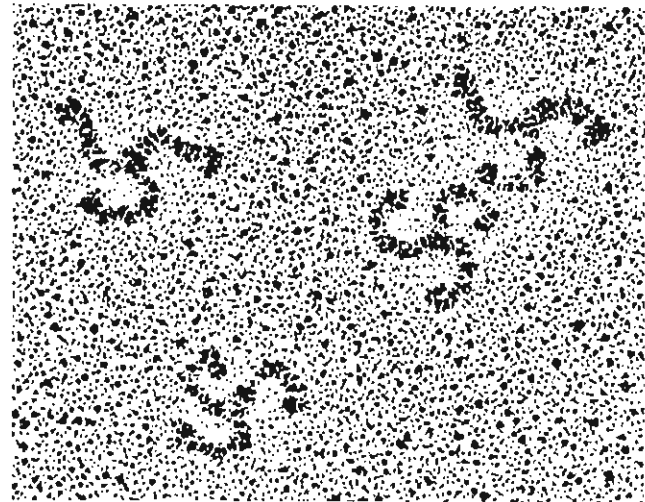


(c)

0.1 μ m

FIGURA 8-37. Fosillas revestidas. a) Micrografía electrónica de una réplica tomada de la superficie extracelular de un fibroblasto completo congelado en seco e incubado con LDL y colesterol. Se observan partículas de LDL y colesterol como gotas presumiblemente fijadas a receptores localizados sobre la superficie extracelular de la fosilla revestida. b) Micrografía electrónica de una réplica tomada de la superficie citoplásmica de una fosilla revestida de fibroblasto. Las fosillas revestidas se componen de una red poligonal relativamente aplanada y en relación con la superficie interna de la membrana plasmática. c) Micrografía electrónica de la superficie citoplásmica mostrando la membrana plasmática invaginada y rodeada por una red de clatrina que adopta forma hemisférica. (Según John Heuser y Louise Evans, *J. Cell Biol.* 84:568, 1980; con permiso de Rockefeller University Press.)

no permanezcan en la membrana plasmática. Las moléculas de adaptina empleadas en la membrana plasmática para formar vesículas revestidas son diferentes de las incorpora-



50 nm

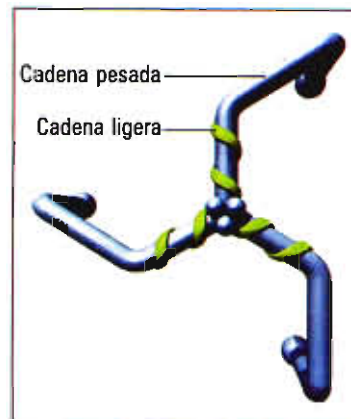
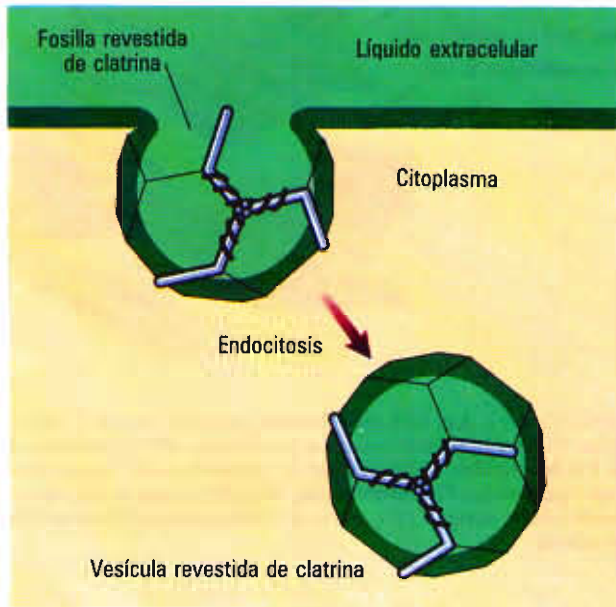


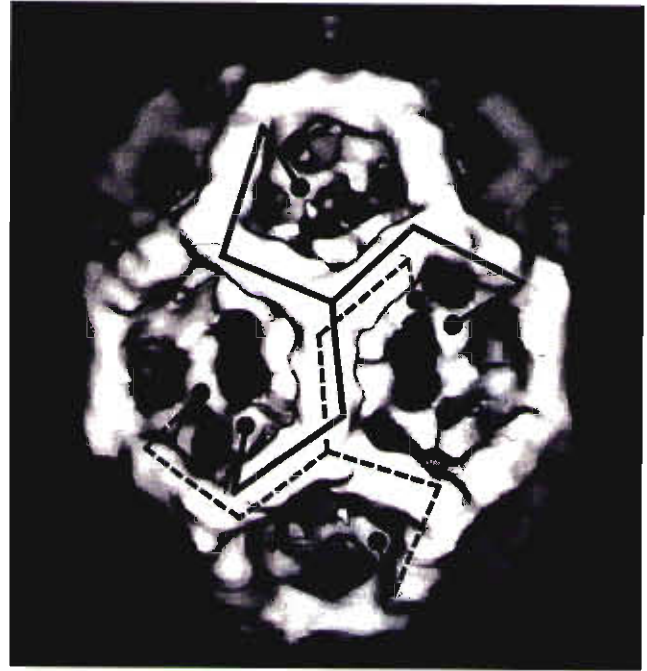
FIGURA 8-38. Trisqueliones de clatrina. Micrografía electrónica de una preparación sombreada con metal de trisqueliones de clatrina. En el recuadro se muestra el trisquelión compuesto de tres cadenas pesadas. La "extremidad" interna de cada cadena pesada se une a una cadena ligera más pequeña. (Fotografía según Ernst Ungewickell y Daniel Branton, reproducida con permiso de *Nature*, vol. 289, p. 421, 1981, copyright 1981, Macmillan Magazines Limited.)

das en las vesículas revestidas formadas por gemación a partir de la red *trans* de Golgi. En la micrografía por fluorescencia de la figura 8-23, b, es evidente la diferente distribución de estos dos grupos de adaptinas.

Al minuto de su formación, la vesícula endocítica revestida pierde su cubierta de clatrina y se convierte en una vesícula de superficie lisa que de ordinario se fusiona con un endosoma temprano (pág. 310). En la mayor parte de los casos, el pH bajo del compartimento endosómico temprano provoca la liberación del ligando de su receptor. Se cree que la mayor parte de los receptores no enlazados se concentran en una porción de la membrana que los separa del endosoma y retorna los receptores a la membrana plasmática (fig. 8-41), donde pueden participar en otro turno de endocitosis. En algunos casos, igual que con la captación del factor de crecimiento epidérmico (FCE), tanto el receptor como el ligando pueden transportarse al lisosoma para su desdoblamiento. En estos sistemas, la endocitosis sirve como medio para re-



(a)



(b)

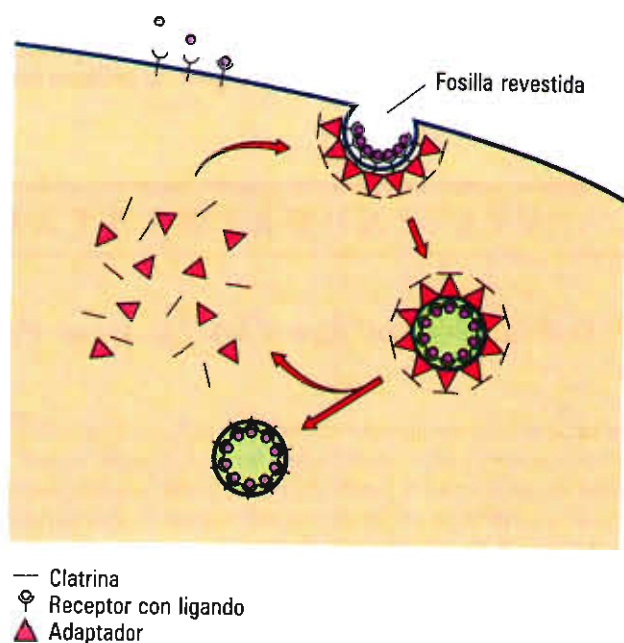
FIGURA 8-39. Ensamblado molecular de una vesícula revestida. a) Esquema de la incorporación de trisqueliones en la red externa de clatrina de una vesícula revestida. b) Modelo que muestra el empacamiento propuesto de las subunidades de trisquelion. Dos trisqueliones aparecen superpuestos dentro de la red. Cada extremidad de un trisquelion se extiende desde un vértice a lo largo de los bordes de dos polígonos vecinos y luego retorna al interior con su dominio terminal formando la capa interna observada en esta reconstrucción. (b: Según G.P.A. Vigers, R.A. Crowther y B.M.F. Pearse, EMBO J. 5:533, 1986, con permiso de Oxford University Press.)

gular el número de moléculas del receptor localizadas en la superficie de la célula.

La vesícula revestida (y la vesícula no revestida que se origina de ella) se puede imaginar como un sistema de entrega que transporta un ligando específico desde el espacio extracelular a un sitio particular dentro de la célula. En la mayor parte de los casos, el ligando finalmente se entrega a un lisosoma para procesamiento metabólico adicional, pero como se ilustra en el siguiente ejemplo, éste no siempre es el caso. Los mamíferos recién nacidos dependen de la leche de su madre, que les suministra anticuerpos contra posibles patógenos. Estos anticuerpos se captan en el conducto digestivo donde se enlazan a receptores localizados en fosillas

revestidas situadas en la superficie apical del epitelio intestinal. En vez de ser transportados a un endosoma, las vesículas revestidas que contienen anticuerpos se transportan a través de toda la longitud de la célula epitelial, donde se

FIGURA 8-40. Las fosillas revestidas facilitan la captación selectiva de proteínas integrales de membrana con sus respectivos ligandos. La captación de receptores específicos de membrana en la membrana plasmática ocurre por un mecanismo similar al descrito en la figura 8-23 para el transporte de materiales en vesículas revestidas de clatrina de la red *trans* de Golgi. La clatrina se ensambla sobre la superficie exterior de la capa de adaptadores que tienen doble función: se enlazan a moléculas de clatrina sobre la superficie externa y a los extremos citoplásmicos de receptores específicos de membrana sobre su superficie interna. Los receptores de membrana, a su vez, se unen a ligandos específicos. Como resultado de estas diferentes interacciones, los complejos de receptor específico-ligando se incorporan a una vesícula recubierta y son transportados al interior de la célula, en tanto que otras proteínas de membrana incapaces de enlazarse a los adaptadores permanecen en la membrana plasmática.



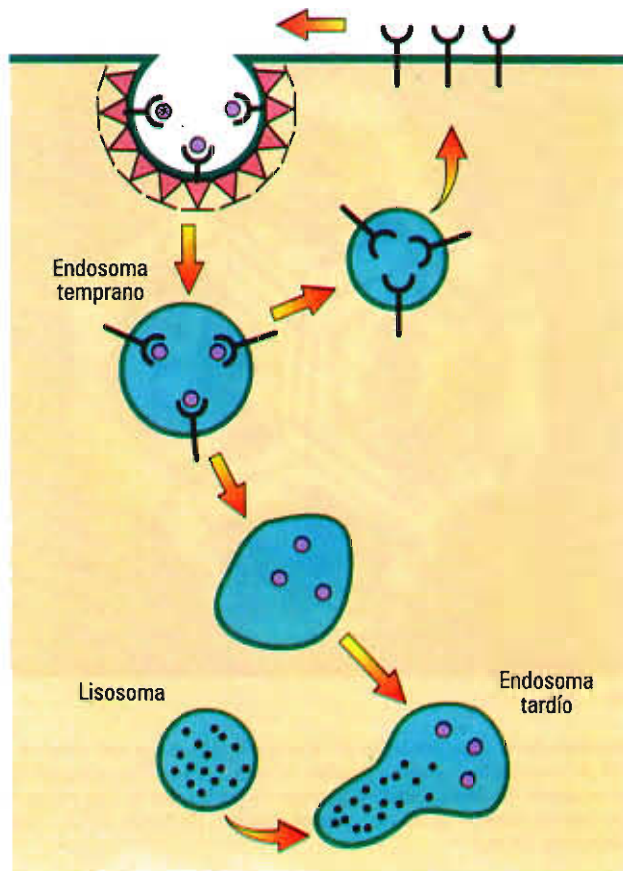


FIGURA 8-41. Reciclamiento de receptores de la membrana plasmática. En el modelo que aquí se muestra, los receptores de la membrana plasmática se separan de su ligando en un endosoma temprano. Los receptores se reúnen dentro de una vesícula membranosa y retornan a la membrana plasmática.

fusionan con la membrana plasmática basal y liberan los anticuerpos en el torrente sanguíneo del lactante.

LDL y metabolismo del colesterol. Entre muchos ejemplos de endocitosis mediada por receptor, la primera estu-

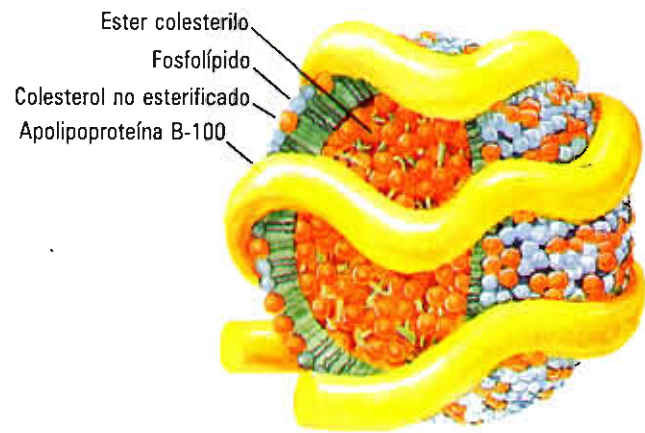


FIGURA 8-42. Las LDL de colesterol consisten en casi 1 500 moléculas de éster colesteroilo rodeadas por una recubierta anfipática de casi 800 fosfolípidos, 500 moléculas de colesterol y una sola molécula de apolipoproteína B (peso molecular, 550 kD) que interactúa específicamente con el receptor LDL que se proyecta a partir de la membrana plasmática.

diada y mejor comprendida es la que suministra colesterol exógeno a las células. El colesterol es una molécula hidrofoba que no puede transportarse en la sangre en estado libre. En vez de ello, se transporta como un complejo gigante denominado *lipoproteína de baja densidad* (LDL). La partícula LDL mostrada en la figura 8-42 contiene un núcleo central de casi 1 500 moléculas de colesterol esterificado para formar ácidos grasos de cadena larga. Este núcleo está rodeado por una capa de fosfolípidos y sus proteínas relacionadas.

Los receptores LDL son transportados a la membrana plasmática, donde se concentran en las fosillas revestidas, incluso en ausencia de ligando. Como consecuencia, los receptores están "a la espera" sobre la superficie de la célula para captar estas partículas de lipoproteínas en el momento que estén disponibles. Una vez que las partículas LDL se unen a una fosilla revestida, la fosilla se invagina para formar una vesícula revestida, el recubrimiento de

LA VIA EXPERIMENTAL

Endocitosis mediada por receptores

De ordinario, el desarrollo embrionario se inicia con la fusión de un minúsculo espermatozoide y un óvulo mucho mayor. El óvulo se desarrolla a partir de oocitos, que en condiciones típicas acumulan materia vitelina sintetizada en otra parte del cuerpo de la mujer. ¿Cómo penetran las proteínas de peso molecular elevado del material vitelino al oocito? En 1964, Thomas Roth y Keith Porter de la Universidad de Harvard

publicaron un trabajo acerca del mecanismo mediante el cual las proteínas del material vitelino pueden ser captadas al interior del oocito de mosquito.¹ Observaron que durante las etapas de crecimiento rápido del oocito (luego que el animal ingiere sangre) hay incremento espectacular del número de depresiones similares a fosillas observadas en la superficie del oocito. Las fosillas formadas por invaginación de la superficie de la

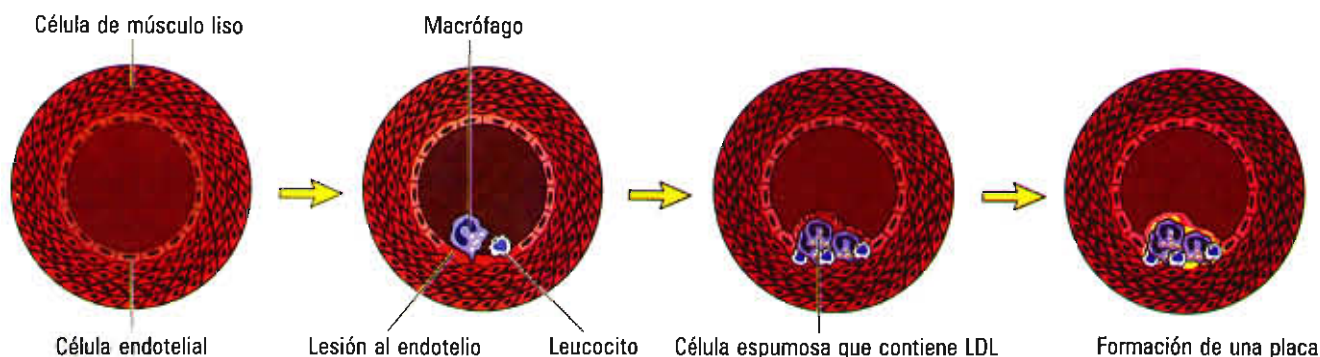


FIGURA 8-43. Placa aterosclerótica. El proceso causante de la aterosclerosis aún no es bien comprendido. En la actualidad se piensa que la formación de una placa se inicia con la aparición de una forma oxidada de LDL que atrae células de músculo liso y macrófagos. Al parecer, estas células ingieren LDL y se depositan como células espumosas en la pared de la arteria. El depósito adicional de LDL, combinado con el crecimiento de las células de músculo liso en la pared arterial, conduce a la oclusión del vaso.

clatrina se desensambla y los receptores LDL son reciclados de vuelta a la membrana plasmática (como se muestra en la figura 8-41). Mientras tanto, las partículas LDL se liberan en los lisosomas donde se descompone el componente proteínico y se libera colesterol para emplear en la célula en el ensamblado de la membrana o en otros procesos metabólicos (p. ej., síntesis de hormonas esteroideas). El número de receptores LDL presentes en determinada célula es modulado por las necesidades metabólicas de la célula. Si ésta crece activamente y sintetiza grandes cantidades de membrana o produce hormonas esteroideas, la cantidad de receptores aumenta y es mayor el número de partículas LDL captadas del medio que las rodea. Los pasos que condujeron al descubrimiento de la endocitosis mediada por receptor y el paso al interior de las LDL se describen con detalle en *La vía experimental: Endocitosis mediada por receptores*.

La concentración de LDL (o el contenido de colesterol) en la sangre guarda estrecha correlación con el desarrollo de aterosclerosis, padecimiento caracterizado por reducción del calibre de las arterias. La oclusión arterial es consecuencia de un proceso complejo y mal comprendido que incluye

depósito de placas que contienen LDL en la pared interna de los vasos (fig. 8-43). Además de reducir el flujo sanguíneo, las placas ateroscleróticas actúan como sitios para la formación de coágulos sanguíneos que pueden impedir por completo el flujo de sangre a través de un vaso. Los coágulos sanguíneos formados en las arterias coronarias son la causa principal de infarto al miocardio (ataque cardíaco).

Las LDL no son el único agente que transporta colesterol en la sangre. Las **HDL (lipoproteínas de alta densidad)** poseen una estructura similar pero contienen proteínas diferentes y desempeñan un papel fisiológico distinto en el cuerpo. En tanto las LDL sirven principalmente para llevar moléculas de colesterol del hígado, donde son empacadas, a través de la sangre hacia las células del cuerpo, las HDL transportan colesterol en dirección opuesta, desde las células del cuerpo hacia el hígado, donde es captado por endocitosis y excretado como parte de la bilis. Así como las concentraciones elevadas de LDL se relacionan con mayor riesgo de ataque cardíaco, las concentraciones altas de HDL se asocian a menor riesgo. Las HDL tienen este efecto debido a que permiten al hígado eliminar colesterol de la sangre.

membrana plasmática estaban cubiertas en su superficie interna por un revestimiento vellosos. En una afirmación profética, Roth y Porter sugirieron que las fosillas eran "superficies diferenciadas dedicadas exclusivamente a captar proteínas y transportarlas al interior del oocito". Postularon que las proteínas del material vitelino eran adsorbidas específicamente sobre la superficie externa de la membrana de las fosillas recubiertas que a continuación se invaginan para formar vesículas revestidas. Las vesículas revestidas pierden su cubierta vellosa y se fusionan entre sí para formar los grandes corpúsculos vitelinos enlazados a la membrana característicos del oocito maduro.

Las primeras observaciones acerca de la estructura de las vesículas revestidas fueron obtenidas en 1969 por Toku Kanaseki y Ken Kadota, de la Universidad de Osaka.² El examen

con microscopio electrónico de una fracción vesicular cruda aislada de cerebro de cobayo reveló que las vesículas revestidas estaban cubiertas por una redcilla poligonal (fig. VE 8-1). Estos investigadores sugirieron que el revestimiento era un mecanismo para controlar el plegamiento de la membrana plasmática durante la formación de vesículas.

Los primeros estudios de la naturaleza bioquímica de la vesícula revestida fueron publicados en 1975 por Barbara Pearse, del *Medical Research Council* en Cambridge, Inglaterra.³ Pearse desarrolló un procedimiento mediante el cual las vesículas de membranas del cerebro de cerdo fueron centrifugadas a través de una sucesión de gradientes de densidad de sacarosa hasta obtener una fracción purificada de vesículas revestidas. La proteína de estas vesículas se solubilizó y fraccionó por

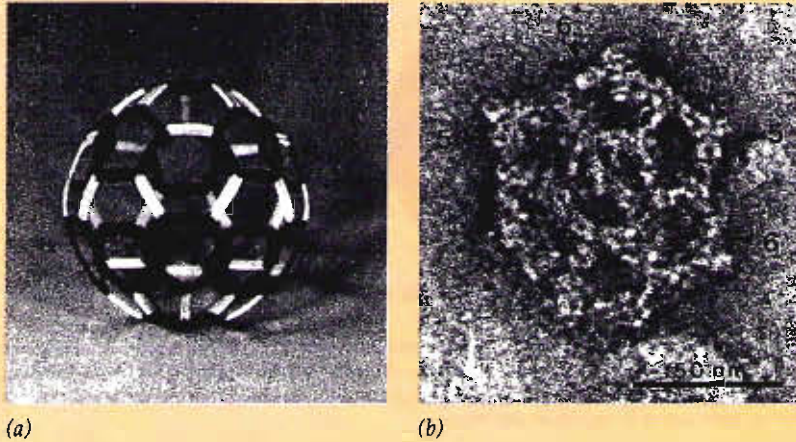


FIGURA VE 8-1. a) Modelo manual de una "canastilla vacía" que forma la red superficial de una vesícula revestida. b) Micrografía de alta resolución electrónica de una canastilla vacía. Los números 5 y 6 representan un pentágono y un hexágono, respectivamente. (Según Toku Kanaseki y Ken Kadota, J. Cell Biol. 42:216, 1969, con permiso de Rockefeller University Press.)

electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (EGPA-DSS, sección 17-7). Los resultados indicaron que el revestimiento contiene una especie predominante de proteínas con peso molecular de unos 180 000 daltons (fig. VE 8-2); Pearse denominó clatrina a esta proteína. Encontró la misma proteína (según el peso molecular y el mapeo de péptidos) en preparaciones de vesículas revestidas aisladas de diferentes tipos de células obtenidas de varias especies de animales.⁴

Conforme se desarrollaba la investigación descrita, en 1973 se iniciaba una línea de estudio aparentemente independiente en los laboratorios de Michael Brown y Joseph Goldstein, en la University of Texas Medical School, en Dallas. Brown y Goldstein se interesaron en la enfermedad hereditaria *hipercolesterolemia familiar* (HF). Las personas homocigotas para el gen defectuoso (alelo HF) mostraban concentraciones muy elevadas de colesterol en el suero (800 mg/100 ml en comparación con 200 mg/100 ml para una persona normal), invariablemente desarrollaban obstrucción grave de arterias (aterosclerosis) y en general morían de ataque cardíaco antes de cumplir 20 años de edad. En aquel tiempo se sabía muy poco acerca de los defectos fisiológicos o bioquímicos fundamentales de esta enfermedad.

Brown y Goldstein iniciaron sus estudios de la HF examinando el metabolismo del colesterol en fibroblastos cultivados derivados de la piel de individuos normales e individuos afectados por hipercolesterolemia familiar. Observaron que las lipoproteínas que contienen colesterol (como las LDL) presentes en el medio inhiben la enzima que controla la tasa de biosíntesis de colesterol, reductasa HMG-CoA (fig. VE 8-3).⁵ Por lo tanto, la adición de LDL al medio de cultivo donde crecían los fibroblastos normales produjo disminución del nivel de actividad de reductasa HMG-CoA y la correspondiente disminución de la síntesis de colesterol en los fibroblastos. Cuando se midió la concentración de reductasa HMG-CoA en fibroblastos derivados de HF se observó que eran 40 a 60 veces mayor que la de fibroblastos en cultivos testigo.⁶ Además, la actividad de las enzimas en los fibroblastos de HF no era afectada en absoluto por la presencia de LDL en el medio (fig. VE 8-4). Brown y Goldstein concluyeron que "la anomalía genética primaria no implica al gen estructural de la propia enzima,

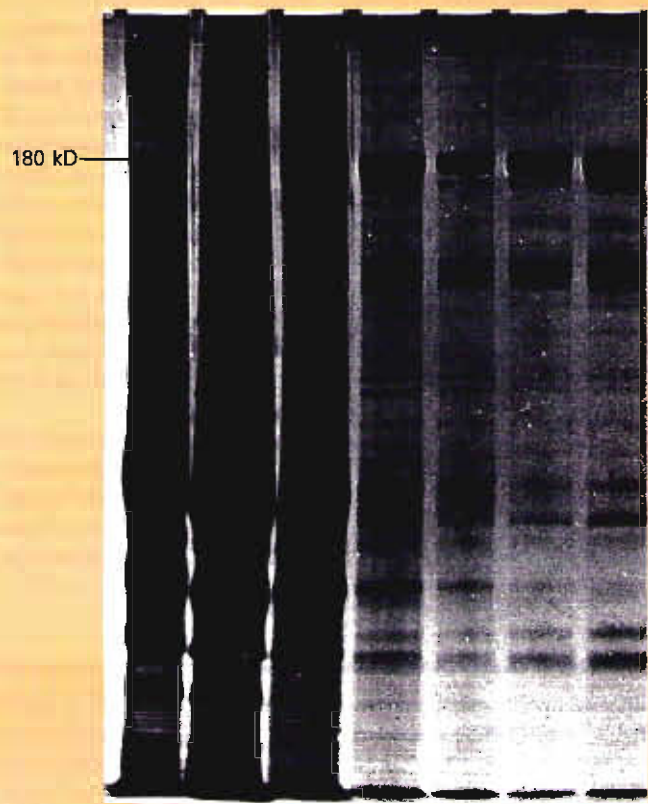


FIGURA VE 8-2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio de varias fracciones obtenidas de cerebro de cerdo. Las primeras tres columnas representan fracciones tomadas de: 1) extracto crudo de tejido cerebral; 2) sobrenadante de una muestra del extracto centrifugado a baja velocidad, y 3) gránulo obtenido por centrifugación de una preparación cruda que contiene vesículas revestidas. Las últimas cuatro columnas representan proteínas obtenidas de preparaciones purificadas del extracto. Las preparaciones purificadas contienen una especie de proteína predominante con peso molecular de 180 000 daltons, a la cual Pearse denominó clatrina. (Según B.M.F. Pearse, J. Mol. Biol. 97:96, 1975.)

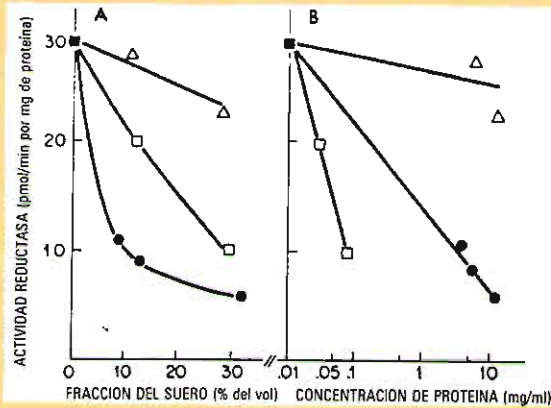


FIGURA VE 8-3. Actividad de la reductasa HMG-CoA medida luego de añadir la fracción lipoproteínica de suero de ternera (cuadros claros), suero de ternera no fraccionado (círculos oscuros), o la fracción no lipoproteínica del suero de ternera (triángulos claros). Es evidente que las lipoproteínas deprimen mucho la actividad de la enzima, en tanto que la fracción no lipoproteínica tiene poco efecto. (Según M.S. Brown y cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70:2166, 1973.)

pero se requiere un gen hasta ahora no identificado cuyo producto es necesario para la mediación del control por retroalimentación [de reductasa HMG-CoA] por lipoproteínas".

¿Cómo la presencia de lipoproteínas en el medio puede afectar la actividad de una enzima en el citoplasma de células cultivadas? Para encontrar la respuesta a esta pregunta, Brown y Goldstein realizaron estudios para determinar la naturaleza de la interacción entre células y lipoproteínas. Comenzaron añadiendo LDL radiactivas a un plato de cultivo que contenía una sola capa de fibroblastos derivados de HF o de sujetos humanos normales.⁷ En tanto los fibroblastos normales se enlazaban con afinidad y especificidad elevadas a moléculas de LDL marcadas, las células mutantes prácticamente no mostraron capacidad para enlazarse a estas moléculas de lipoproteína (fig. VE 8-5). Las pruebas indicaron que las células normales poseen un receptor altamente específico para LDL y que este receptor era defectuoso en las células de pacientes con HF. El siguiente paso fue determinar qué ocurre a las LDL después de enlazarse al receptor.

Algunos datos sugirieron que las partículas de LDL enlazadas al receptor eran introducidas a la célula y entregadas a los lisosomas, donde las proteínas de las LDL se desdoblaban y se liberaban moléculas de colesterol libre para utilizar en el ensamblado de la membrana. Por ejemplo, la prueba del papel de los lisosomas en el procesamiento de LDL se obtuvo utilizando fibroblastos de un paciente con un trastorno por almacenamiento lisosómico (pág. 306) caracterizado por acumulación de ésteres de colesterol en sus lisosomas.⁸ La enfermedad resulta de una deficiencia de la enzima lisosómica *lipasa ácida*, que normalmente separa las moléculas de colesterol de los ácidos grasos con los cuales se esterifican. En la figura 8-42 se muestra en qué forma se empaquetan las moléculas de colesterol dentro de las partículas de lipoproteínas de baja densidad. A diferencia de los fibroblastos normales, las células derivadas

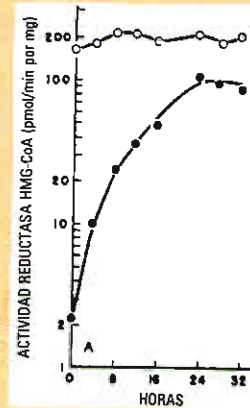


FIGURA VE 8-4. Células de fibroblastos de sujetos de prueba (círculos oscuros) o de pacientes homocigotos para HF (círculos claros) desarrollados en platos de cultivo que contenían 10% de suero de ternera fetal. Al sexto día (que corresponde a la hora cero de la gráfica) se sustituyó el medio por un medio fresco que contenía 5% de plasma humano deficiente en lipoproteína. Al momento indicado se prepararon los extractos y se midió la actividad de la reductasa HMG-CoA. Considerando a las células de prueba, es evidente que al inicio del período de observación la enzima tiene muy poca actividad en estas células, y la razón es que en el medio hay una cantidad suficiente de lipoproteínas que contienen colesterol que las células no necesitan sintetizar por sí mismas. Cuando se cambia el medio por plasma deficiente en lipoproteínas, las células ya no pueden usar el colesterol procedente del medio y por lo tanto aumenta la cantidad de enzima dentro de la célula. En contraste, las células de pacientes HF no respondieron a la presencia ni a la ausencia de lipoproteínas en el medio. (Según J.L. Goldstein y M.S. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70:2805, 1973.)

de un paciente con deficiencia de esta enzima no tienen capacidad para utilizar el colesterol presente en las partículas de LDL añadidas al medio de cultivo (fig. VE 8-6). En consecuencia, las concentraciones de reductasa HMG-CoA se mantuvieron muy elevadas en estas células a pesar de la adición de LDL al medio de cultivo. Estos datos suministran fuertes pruebas de que los ésteres externos de colesterol que penetran a la célula como parte de las LDL son suministrados a los lisosomas para liberar colesterol.

Para visualizar el proceso de enlace al receptor y el paso al interior, Brown y Goldstein colaboraron con Richard Anderson, quien había estudiado la estructura celular con el microscopio electrónico. El grupo incubó fibroblastos de sujetos normales y enfermos de HF con LDL que presentaban uniones covalentes con la proteína ferritina que contiene hierro. Debido a los átomos de hierro, las moléculas de ferritina pueden dispersar un rayo de electrones y por lo tanto visualizarse directamente en el microscopio electrónico. Cuando se incubaron fibroblastos normales con LDL y ferritina a 4°C, temperatura a la cual los ligandos se pueden enlazar a la superficie celular, pero no pueden ser llevados al interior, las partículas de LDL y ferritina aparecieron enlazadas a la superficie celular. Un examen más detallado reveló que las partículas de LDL no se distribuyeron al azar sobre la superficie de la célula, sino se localizaron en segmentos cortos (0.5 mm) de la membrana plasmática,

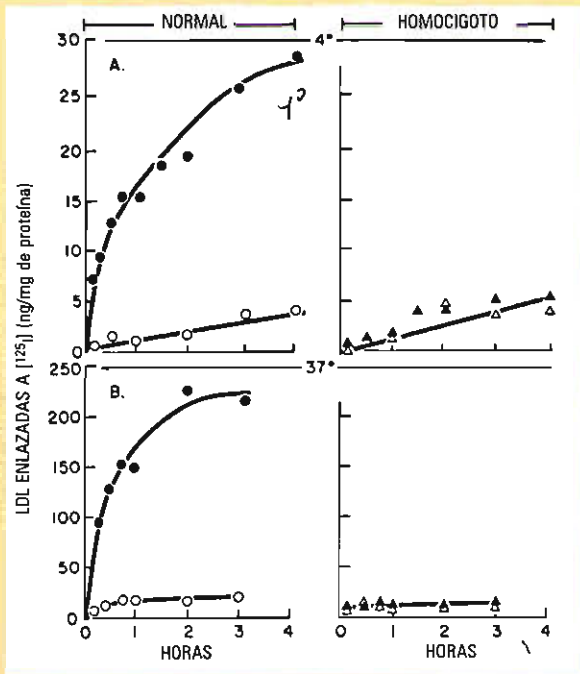


FIGURA VE 8-5. Tiempo de curso de las LDL radiactivas marcadas con ^{125}I enlazadas a células de un sujeto normal (círculos) y un homocigoto con HF (triángulos) a 4°C y 37°C. Las células se incubaron en un amortiguador que contenía 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ^{125}I -LDL en presencia (círculos y triángulos claros) y ausencia (círculos y triángulos oscuros) de 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LDL no radiactivas. Es evidente que en ausencia de LDL no radiactivas, las células normales unen cantidades significativas de LDL marcadas, en tanto que las células de pacientes HF no lo hacen. El mismo resultado se observó con ambas temperaturas, lo que indica que el enlace no depende de energía (puesto que a 4°C no se forma ATP). El enlace de LDL marcadas se reduce mucho en presencia de LDL no radiactivas, lo que indica que las lipoproteínas no marcadas compiten con las marcadas por los sitios de enlace, y por tanto el enlace de la lipoproteína a las células es específico (o sea, no es resultado de un enlace inespecífico). (Según M.S. Brown y J.L. Goldstein, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71:790, 1974.)

donde ésta presentaba indentaciones y estaba recubierta por material "veloso" (fig. VE 8-7).⁹ Estos segmentos de la membrana corresponden a las fosillas recubiertas originalmente descritas por Roth y Porter y encontradas desde entonces en varios tipos de células. Aunque se observó que las células de pacientes con HF tenían un número similar de fosillas recubiertas sobre su superficie, las LDL-ferritina no se enlazaron a estas células mutantes. Los resultados apoyan la hipótesis de que el alelo HF mutante codifica un receptor que no puede enlazarse a lipoproteínas de baja densidad. Estudios subsiguientes de microscopía electrónica acerca del paso al interior de las LDL y ferritina revelaron la vía endocítica para llevar al interior estas partículas de lipoproteínas, como se describe en el texto.¹⁰

Según estos resultados, el grupo postuló que el rápido paso al interior de las LDL enlazadas al receptor depende estrictamente de la localización de los receptores de LDL en las fosillas revestidas. De este postulado se deduce que si un receptor de LDL no se localiza dentro de una fosilla revestida, no

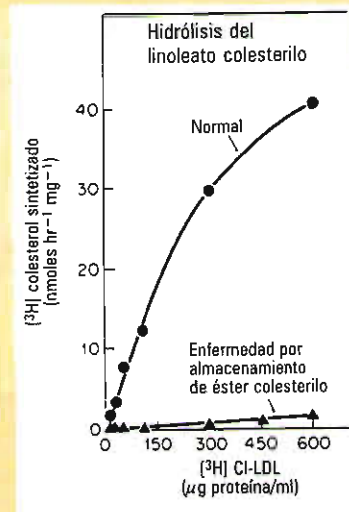


FIGURA VE 8-6. Esteres colesterilo enlazados a LDL añadidos a extractos de células preparadas a partir de fibroblastos normales (círculos oscuros) o fibroblastos de pacientes con enfermedad por almacenamiento lisosómico (triángulos oscuros) que carecen de la enzima lisosómica requerida para liberar el colesterol de su forma esterificada. Se indica la tasa de hidrólisis del éster. Los resultados de este tipo implicaron a los lisosomas en la liberación de colesterol de las partículas de LDL. (Según J.L. Goldstein y cols. J. Biol. Chem. 250:8490, 1975.)

tiene capacidad para entregar su ligando enlazado a los lisosomas celulares, y por lo tanto será incapaz de afectar la biosíntesis de colesterol en la célula. En esa época se descubrió un receptor de LDL con una mutación de tipo diferente. Los receptores de LDL que poseen este defecto (conocido como mutación J.D., por el paciente en quien se observó) pueden enlazarse a cantidades normales de LDL marcadas con isótopo radiactivo, aunque la lipoproteína enlazada al receptor no pase al interior y por consiguiente no pueda llegar a los lisosomas citoplásmicos para su procesamiento.¹¹ Anderson y sus colaboradores postularon que el receptor de LDL es una proteína transmembrana que normalmente se localiza en las fosillas revestidas debido a que su dominio citoplásmico se enlaza específicamente a un componente de dichas fosillas revestidas, tal vez clatrina (pero más tarde se identificó como adaptina). Debido al defecto en su dominio citoplásmico, el receptor mutante J.D. no tiene capacidad para ubicarse en las fosillas revestidas de la célula. Las personas con esta mutación muestran el mismo fenotipo que los pacientes cuyos receptores son incapaces de enlazarse a lipoproteínas de baja densidad.

Estudios subsiguientes determinaron que el receptor de LDL normal es una glucoproteína transmembrana de 839 aminoácidos; los 50 aminoácidos situados sobre el extremo C terminal de la proteína se extienden al interior de la membrana como un dominio citoplásmico. El análisis del receptor mutante J.D. muestra que en esta proteína sólo hay una sustitución de aminoácido en el dominio citoplásmico; un residuo de tirosina localizado normalmente en la posición 807 es sustituido por una cisteína.¹² Esta sola alteración en la secuencia de aminoácidos oblitera totalmente la capacidad de la proteína para concentrarse en las fosillas revestidas.

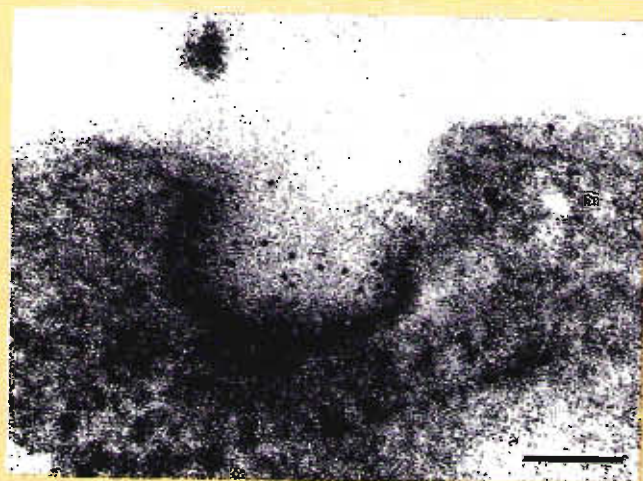


FIGURA VE 8-7. Micrografía electrónica que muestra el enlace de las LDL a fosillas revestidas de fibroblastos humanos. Las LDL se hicieron visibles conjugándolas con partículas de ferritina que contienen hierro electrónicamente denso. La barra equivale a 100 nm. (Según R.G.W. Anderson, M.S. Brown y J.L. Goldstein, *Cell* 10:356, 1977, con permiso de Cell Press.)

Cuando se hizo esta determinación en 1986 ya se había demostrado que algunos otros ligandos penetran a la célula por endocitosis mediada por receptor. Se volvió la atención a las secuencias de aminoácidos de las colas citoplásmicas de otros receptores localizados en las fosillas revestidas. ¿Había una "señal común de paso al interior"? Aunque se encontró que estos receptores no comparten una secuencia común de aminoácidos, muchos de ellos contienen un residuo tirosina esencial. Se sugirió que aunque las secuencias pueden diferir,

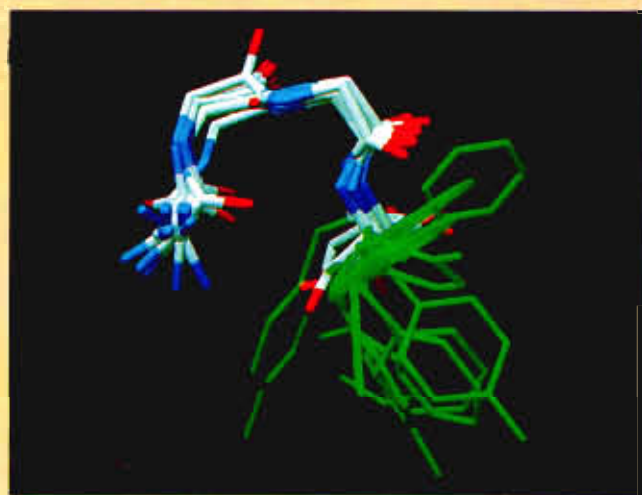


FIGURA VE 8-8. Ocho tetrapéptidos diferentes variantes de una secuencia observada en el dominio citoplásmico de la transferrina y de receptores de LDL. Todos los péptidos aquí mostrados adoptan una conformación similar de vueltas cerradas que coloca las cadenas laterales de tirosina en posición similar proyectándose desde el plano hacia la vuelta cerrada. (b: Según James F. Collawn y cols. *Cell* 63:1066, 1990, con permiso de Cell Press.)

estos receptores quizá compartan una estructura secundaria similar que serviría para que fueran reconocidos por el mismo complejo adaptador de la fosilla revestida (pág. 313). Esta hipótesis ha sido probada en algunos laboratorios que sintetizaron partículas pequeñas (por ejemplo, cuatro a nueve aminoácidos) correspondientes a las secuencias observadas en las colas citoplásmicas de los receptores que pasan al interior por medio de fosillas recubiertas. Cuando se analizan por espectroscopia de resonancia magnética nuclear, estos péptidos de secuencias diversas adoptan una conformación muy similar caracterizada por un giro β apretado con el residuo tirosina esencial localizado en un extremo (fig. VE 8-8).^{13,14} Las estructuras de este tipo pueden actuar como "anzuelos" que las proteínas dejan colgando en las fosillas revestidas conforme las moléculas del receptor se mueven entre la bicapa líquida de la membrana plasmática.

BIBLIOGRAFIA

1. Roth, T.F. y Porter, K.R. 1964. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Cell Biol.* 20:313-332.
2. Kanaseki, T. y Kadota, K. 1969. The "vesicle in a basket". *J. Cell Biol.* 42:202-220.
3. Pearse, B.M.F. 1975. Coated vesicles from pig brain: Purification and biochemical characterization. *J. Mol. Biol.* 97:93-96.
4. Pearse, B.M.F. 1976. Clathrin: A unique protein associated with the intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73:1255-1259.
5. Brown, M.S., Dana, S.E. y Goldstein, J.L. 1973. Regulation of HMG CoA reductase activity in human fibroblasts by lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70:2162-2166.
6. Goldstein, J.L. y Brown, M.S. 1973. Familial hypercholesterolemia: Identification of a defect in the regulation of HMG CoA reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70:2804-2808.
7. Brown, M.S. y Goldstein, J.L. 1974. Familial hypercholesterolemia: Defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of HMG CoA reductase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71:788-792.
8. Goldstein, J.L. y cols. 1975. Role of lysosomal acid lipase in the metabolism of plasma low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 250:8457-8495.
9. Anderson, R.G.W., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. 1976. Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73:2434-2438.
10. Anderson, R.G.W., Brown, M.S. y Goldstein, J.L. 1977. Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* 10:351-364.
11. Anderson, R.G.W., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. 1977. A mutation that impairs the ability of lipoprotein receptors to localise in coated pits on the cell surface of human fibroblasts. *Nature* 270:695-699.
12. Davis, C.G. y cols. 1986. The J.D. mutation in familial hypercholesterolemia: Amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. *Cell* 45:15-24.
13. Bansal, A. y Gierasch, L.M. 1991. Internalization signal of the LDL receptor adopts a reverse-turn conformation. *Cell* 67:1195-1201.
14. Eberle, W. y cols. 1991. The essential tyrosine of the internalization signal in lysosomal acid phosphatase is part of a β turn. *Cell* 67:1203-1209.

SINOPSIS

El citoplasma de las células eucariotas contiene un sistema de organelos membranosos, incluyendo retículo endoplasmático, complejo de Golgi y lisosomas que funcional y estructuralmente se relacionan entre sí y con la membrana plasmática. Estos diferentes organelos membranosos son parte de una red dinámica integrada en la cual se intercambian materiales en una y otra dirección como parte de vesículas de transporte que se forman por gemación en un compartimiento y se fusionan con otro. Las membranas y los materiales que encierran se desplazan a través de la célula en vesículas de transporte a lo largo de vías definidas. Una vía biosintética secretoria lleva proteínas desde su sitio de síntesis en el RE a través del complejo de Golgi a su destino final (un organelo, la membrana plasmática o el espacio extracelular), en tanto que una vía endocítica desplaza material en dirección opuesta desde la membrana plasmática o el espacio extracelular al interior de la célula. Las vesículas y la carga que encierran son enviadas a su destino apropiado mediante señales específicas que poseen las propias proteínas (p. 277).

El retículo endoplásmico (RE) es un sistema de túbulos, cisternas y vesículas que dividen el citoplasma en un espacio luminal dentro de las membranas del RE y un espacio citoplásmico por fuera de ellas. El RE se divide en dos tipos muy amplios, el RE rugoso (RER), que de ordinario se presenta como cisternas aplanadas y cuyas membranas tienen ribosomas unidos, y el RE liso (REL), que en condiciones típicas se muestra como compartimientos tubulares y cuyas membranas carecen de ribosomas. Las funciones del REL varían de una célula a otra e incluyen la síntesis de hormonas esteroides, detoxificación de una gran variedad de compuestos orgánicos, movilización de glucosa a partir de glucosa 6-fosfato, y secuestro de iones calcio. Las funciones del RER son similares en diferentes tipos de células; incluyen síntesis de proteínas que serán secretadas, proteínas lisosómicas, proteínas integrales de membrana y lípidos de membrana (p. 280).

Las proteínas sintetizadas en los ribosomas enlazados a la membrana del RER pueden reconocerse por una secuencia de señales hidrófoba que de ordinario se sitúa cerca del N-terminal del polipéptido nascente. Conforme surge la secuencia de señales del ribosoma, se enlaza a una partícula para reconocimiento de señales (PRS) que detiene la síntesis y actúa como etiqueta para mediar el enlace del complejo a un receptor de la PRS presente sólo en la membrana del retículo endoplásmico rugoso. Luego del enlace, la PRS se libera de la membrana y el polipéptido nascente pasa a través de un agujero revestido de proteína en la membrana del RE hacia el interior de la luz del retículo endoplásmico. Las proteínas lisosómicas y secretorias se translocan al interior de la luz del RE en su totalidad, en tanto que las proteínas de membrana se integran a la bicapa de lípidos gracias a una o más secuencias que detienen la transferencia de partículas hidrofobas. Una peptidasa de señal enlazada a la membrana elimina el péptido de señal del polipéptido y la proteína sufre plegamiento y formación de enlaces disulfuro con ayuda de proteínas que residen en la luz del retículo endoplásmico. Las proteínas que no se

pliegan correctamente son reconocidas y destruidas. Una vez que la proteína recién sintetizada se sitúa en la luz o en la membrana del RER, puede desplazarse desde ese sitio hasta su destino específico a lo largo de la vía biosintética (p. 283).

La mayor parte de los lípidos de una membrana celular también se sintetizan en el RE y se desplazan desde este sitio a diferentes destinos. Los fosfolípidos se sintetizan en la cara citosólica del RE y se introducen en la hoja citosólica de la membrana del retículo endoplásmico. Algunas de estas moléculas son transportadas subsecuentemente a la hoja opuesta. La composición lipídica de las membranas está sujeta a modificaciones de varios tipos. Por ejemplo, una proteína intercambiadora de fosfolípidos pueden eliminar selectivamente fosfolípidos de la membrana de un organelo y transportarlos a través del citoplasma, o los grupos cefálicos de lípidos específicos pueden sufrir modificaciones por medios enzimáticos (p. 288).

La adición de azúcares (glucosilación) a los residuos asparagina de proteínas se inicia en el RE rugoso y continúa en el complejo de Golgi. Las secuencias de azúcares de las cadenas de oligosacáridos de las glucoproteínas son determinadas por el tipo y localización de los miembros de una gran familia de glucosiltransferasas, enzimas que transfieren un azúcar específico desde un azúcar nucleótido donador hasta el aceptor específico. Las cadenas de carbohidrato se ensamblan en el RE por transferencia de un azúcar cada vez al dolicol fosfato, una larga molécula hidrófoba integrada a la membrana. Después de ensamblado, el oligosacárido central se transfiere en bloque desde el transportador dolicol a un residuo asparagina de polipéptido. Casi tan pronto como es transferido el bloque de carbohidratos, se inicia su modificación, primero eliminando los residuos glucosa terminales. Las vesículas de la membrana, con su carga incluida, sufren un proceso de gemación en los bordes del RE y se dirigen hacia el complejo de Golgi (p. 289).

El complejo de Golgi funciona como una planta de procesamiento, modificando los componentes de la membrana y la carga sintetizada en el RE antes de enviarlos a su destino. El complejo de Golgi también es sitio de síntesis de los complejos polisacáridos que constituyen la matriz de la pared de células vegetales. Cada complejo de Golgi consta de una pila de cisternas aplanadas en forma de placa con rebordes dilatados y relacionadas con vesículas y túbulos. Los materiales entran a la pila en la cara *cis* y se mueven por transporte vesicular hacia la cara opuesta, o *trans*. Conforme se desplazan, las glucosiltransferasas localizadas en las cisternas de Golgi particulares añaden azúcares, con frecuencia los aminoácidos se modifican y pueden ser eliminadas porciones de polipéptidos. Una vez que las proteínas alcanzan la red *trans* de Golgi (RTG) en el extremo de la pila, están listas para ser clasificadas y enviadas a su destino final celular o extracelular (p. 290).

Las vesículas producidas por gemación del RE y de las cisternas de Golgi están cubiertas por un revestimiento de proteínas (proteínas no clatrin) que se cree desplazan membra-

nas y proteínas de manera inespecífica. Se piensa que estas vesículas participan en un proceso de flujo en bloque en el cual membranas, materiales y líquidos se desplazan como partes constitutivas a través de la célula. Según este punto de vista, una proteína localizada en la membrana, en la luz del RE o en el complejo de Golgi se transporta “automáticamente” de un compartimiento al siguiente y finalmente a la membrana plasmática, excepto cuando contiene información que indica que debe ser retenida en el compartimiento donde reside o cuando se deriva (envía) hacia un destino específico distinto de la membrana plasmática, como el lisosoma (p. 294).

Las proteínas pueden ser retenidas en un compartimiento particular debido a que poseen una señal específica de retención, o ser enviadas a un compartimiento más alejado a lo largo de las vías porque poseen una señal de destino específico. Las señales de retención mejor estudiadas operan para mantener proteínas solubles o de membrana en el RE. Si estas proteínas escapan del RE y alcanzan la cisterna *cis* de Golgi, son devueltas a su compartimiento apropiado por un mecanismo de reciclamiento mediado por receptor. Se piensa que las yemas vesiculares de un compartimiento donador poseen proteínas específicas en sus membranas (miembros de la familia de v-SNARE) que reconocen una proteína complementaria (miembros de una familia de t-SNARE) localizadas en el compartimiento específico (del aceptor). El encuentro de las dos membranas es mediado por las SNARE, en tanto que la fusión de la membrana aparentemente se desencadena por un cambio de conformación de las proteínas enlazadas a GTP luego de la hidrólisis del mismo (p. 296).

La clasificación de proteínas en la vía biosintética ocurre sobre todo en los últimos compartimientos de Golgi, la red *trans* de Golgi. En el compartimiento de la RTG se originan dos tipos de vesículas: 1) vesículas cubiertas con proteínas no clatrina, como las proteínas de revestimiento, que mueven material de manera no selectiva y son materiales constitutivos de la membrana plasmática, y 2) vesículas recubiertas de clatrina que contienen una proteína de membrana particular que dirige la vesícula a un destino específico. Las vesículas recubiertas de clatrina transportan cargas específicas en virtud de adaptadores que forman una capa entre la recubierta externa de clatrina y la membrana de la vesícula. Una parte del adaptador se enlaza específicamente a la recubierta de clatrina y la otra se enlaza también específicamente al extremo citoplásmico de las proteínas de membrana, que a su vez se unen a sus correspondientes ligandos dentro de la luz de la vesícula (p. 297).

Las enzimas lisosómicas producidas en el RER se clasifican en la RTG y son transportadas a su destino por los lisosomas gracias a residuos manosa fosforilados que se encuentran

entre sus cadenas de oligosacáridos. Conforme pasan a través de las cisternas de Golgi, varias enzimas lisosómicas son reconocidas por enzimas que añaden fosfato de glucosamina a ciertos residuos manosa en el centro del oligosacárido. A continuación la glucosamina es eliminada, dejando residuos manosa fosfato reconocibles por los receptores de membrana en la RTG, que causa que las enzimas se empaquen en las vesículas que se dirigen al lisosoma (p. 299).

Los lisosomas son organelos enlazados a la membrana que contienen disposición diferente de hidrolasas ácidas capaces de digerir casi todo tipo de macromoléculas biológicas. Morfológicamente, los lisosomas muestran un aspecto diverso que refleja la gran variedad de materiales que pueden digerir. Entre sus numerosas funciones, los lisosomas descomponen materiales, como bacterias y desperdicios, que llegan a la célula por fagocitosis; desdoblan organelos citoplásmicos envejecidos por un proceso denominado autofagia y digieren las macromoléculas entregadas a través de los endosomas por un proceso de endocitosis mediado por receptor. En muchos protistas unicelulares, los lisosomas digieren materiales nutrientes ingeridos por fagocitosis, en tanto que en los mamíferos y otros animales los lisosomas desempeñan un papel clave en la defensa inmunológica (p. 300).

Las vacuolas vegetales realizan diversas actividades. Las vacuolas sirven como almacén transitorio para solutos y macromoléculas; contienen compuestos tóxicos empleados para la defensa; suministran un recipiente para desperdicios celulares; mantienen un compartimiento hipertónico que ejerce presión por turgencia contra la pared celular, y son sitios de digestión intracelular mediada por hidrolasas ácidas (p. 305).

Muchas células poseen mecanismos que captan materiales del ambiente extracelular en vesículas citoplásmicas derivadas por invaginación de la membrana plasmática. La fagocitosis es la captación de partículas materiales y la endocitosis es la captación de líquido, solutos disueltos y macromoléculas suspendidas. La fagocitosis puede servir como mecanismo de alimentación o como un sistema celular de defensa. En la endocitosis mediada por receptor, los ligandos específicos se enlazan a los receptores que se proyectan desde la superficie externa de la membrana plasmática. Los receptores se reúnen en fosillas recubiertas de la membrana sobre la superficie citoplásmica por un armazón poligonal formada por moléculas de clatrina de tres extremidades. La redistribución de la rejilla de clatrina facilita la formación de vesículas recubiertas que contienen los materiales llevados al interior. Las vesículas pierden su cubierta, se fusionan con los endosomas y entregan su contenido al lisosoma (p. 308).

PREGUNTAS DE REPASO

1. Mencionar los organelos que componen la vía biosintética en comparación con los que forman parte de la vía endocítica.
2. Describir las diferencias en una autorradiografía de células pancreáticas incubada con aminoácidos marcados durante cinco minutos y fijadas de inmediato en comparación

con una célula marcada y luego seguida durante 40 minutos.

3. ¿Cuáles son las principales diferencias morfológicas entre RER y REL? ¿Las principales diferencias en sus funciones?
4. Describir los pasos entre el momento en que un ribosoma se une a un RNA mensajero que codifica una proteína secretoria y el momento en que la proteína abandona el retículo endoplásmico rugoso.
5. ¿Cómo se introducen a la membrana las proteínas integrales recién sintetizadas? ¿Cómo se introducen los lípidos recién sintetizados?
6. Describir algunas de las formas mediante las cuales algunos de los organelos membranosos pueden mantener su composición única a pesar del tráfico continuo de membranas y materiales que los atraviesan.
7. Describir los pasos que ocurren conforme una proteína secretoria soluble, como la enzima digestiva de una célula pancreática, se desplaza desde el RER a la cisterna *cis* de Golgi. Desde la cisterna *cis* a la red *trans* de Golgi. Desde la red *trans* de Golgi a la membrana plasmática.
8. ¿Cuál es papel del dolicol fosfato en la síntesis de glucoproteínas de la membrana? ¿Cuál es la secuencia de azúcares unidos a la proteína determinada?
9. Describir de qué manera el experimento mostrado en la figura 8-18 es un argumento contra el modelo de maduración para la formación del complejo de Golgi.
10. Describir la diferencia del papel de las vesículas recubiertas de clatrina y las recubiertas por proteínas no de clatrina que se forman en la red *trans* de Golgi.
11. ¿Qué determina la especificidad de interacción entre una vesícula de transporte y el compartimiento de la membrana con la cual se fusiona?
12. Describir los pasos que aseguran que una enzima lisosómica se dirija a un lisosoma y no a una vesícula secretoria.
13. ¿En qué difiere el proceso de glucosilación en el complejo de Golgi del que ocurre en el retículo endoplásmico rugoso?
14. Describir tres funciones distintas de los lisosomas. De vacuolas vegetales
15. Describir los pasos que ocurren entre el enlace de una partícula de LDL a la membrana plasmática de una célula y la entrada de las moléculas de colesterol al citoplasma.

PREGUNTAS ANALÍTICAS

- 1.Cuál de los siguientes polipéptidos, si es que alguno, sería de esperar que careciera de una señal péptida: anticuerpos (IgG, pág. 63), fosfatasa ácida, hemoglobina, proteínas ribosómicas, glucoforina, proteínas del tonoplasto.
2. Supongamos que usted sospecha que un paciente puede sufrir la enfermedad de célula I. ¿Cómo podría decidir si este diagnóstico es correcto empleando células cultivadas del paciente?
3. ¿En qué compartimiento celular se esperaría que una glucoproteína tuviera su mayor contenido de manosa? ¿Es mayor el contenido de *N*-acetilglucosamina? ¿Es mayor el contenido de ácido siálico?
4. El sulfato de condroitina es un glucosaminoglicano. ¿Esperaría usted encontrar este material en la luz del RER? ¿Por qué sí o por qué no?
5. ¿Cuáles son las tres proteínas que se esperaría encontrar como componentes integrales de la membrana RER y que estarían ausentes de la REL? ¿Cuáles son las dos proteínas del REL que no están presentes en el retículo endoplásmico rugoso?
6. Supongamos que se quiere estudiar el proceso de secreción regulada en una célula que carece de gránulos secretorios maduros, o sea, vesículas que contienen material secretorio listo para ser descargado. ¿Cómo se obtendría una célula que careciera de dichos gránulos?
7. ¿Qué tipo de anticuerpo se podría emplear para distinguir entre vesículas recubiertas aisladas formadas en la RTG de aquéllas formadas en la membrana plasmática?
8. La autorradiografía depende de partículas emitidas por átomos radiactivos que inciden sobre una emulsión fotográfica situada en la parte superior de un corte de tejido. Cuando se revela la emulsión, el sitio donde la partícula incide sobre la emulsión aparece como gránulo plateado, como en la figura 8-3, *a*. ¿Cómo piensa usted que el espesor del corte podría afectar la resolución de la técnica, o sea, la capacidad para localizar el sitio preciso en la célula donde se incorpora la radiactividad?
9. ¿En qué parte de una célula sería de esperar que se incorporaran primero los siguientes compuestos: ^3H -leucina, ^3H -ácido siálico, ^3H -manosa, ^3H -colina, ^3H -ácido glucurónico (como precursor de GAG), ^3H -pregnenolona (precursor de hormonas esteroideas), ^3H -ramosa en una célula vegetal (la ramosa es un precursor de pectinas)?
10. ¿Cuál de las siguientes células se esperaría que participaran de manera más intensa en la endocitosis a granel: *a*) un eritrocito; *b*) una célula acinar pancreática; *c*) un macrófago? ¿Por qué?
11. ¿Sería de esperar que las propiedades del lado cisternal de las membranas de Golgi sean más similares al lado extracelular o al lado citoplásmico de la membrana plasmática? ¿Por qué?
12. ¿Qué compartimiento(s) de una célula se relaciona más con cada una de las siguientes: clatrina, iones calcio en una célula muscular esquelética, dolicol fosfato, ribonucleasa y lipasa, digital, receptores de LDL, proteínas de revestimiento, partículas para reconocimiento de señales no enlazadas?
13. Si se incubaba una rebanada de tejido pancreático con ^3H -leucina durante dos horas continuas, ¿en qué parte de las células acinares esperaría usted que se incorporara la radiactividad?
14. Si usted añadiera un fármaco que interfiere con la capacidad de los ribosomas para enlazarse al RNAm, ¿qué efecto

esperaría que tuviera sobre la estructura del retículo endoplásmico rugoso?

15. Una de las mejores maneras de estudiar la secuencia de acontecimientos a lo largo de la vía biosintética es infectar una célula con un virus, como el virus de la estomatitis vesicular. ¿Por qué piensa que una infección viral se presta a este tipo de estudio? ¿En qué se parece esta técnica al empleo de un radioisótopo?

16. No todos los receptores que contienen endocitosis mediada por receptores se localizan en las fosillas recubiertas antes de enlazarse al ligando, pero se concentran en las fosillas recubiertas antes de ser llevadas al interior. ¿Cómo se supone que el enlace de un ligando al receptor provocaría su concentración en una fosilla recubierta?

BIBLIOGRAFIA

Abeijon, C.A. y Hirschberg, C.B. 1992. Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* 17:32-36.

Amara, J.F. y cols. 1992. Intracellular trafficking defects in human disease. *Trends Cell Biol.* 2:145-149.

Bennett, M.K. y Scheller, R.H. 1994. A molecular description of synaptic vesicle membrane trafficking. *Ann. Rev. Biochem.* 63:63-100.

Boman, A.L. y Kahn, R.A. 1995. Arf proteins: The membrane traffic police. *Trends Biochem. Sci.* 20:147-150.

Chrispeels, M.J. y Raikhel, N.V. 1992. Short peptide domains target proteins to plant vacuoles. *Cell* 68:613-616.

Dobberstein, B. 1994. On the beaten pathway. *Nature* 367:599-600.

Dowhan, W. 1991. Phospholipid exchange protein. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:621-625.

Gaut, J.R. y Hendershot, L.M. 1993. The modification and assembly of proteins in the endoplasmic reticulum. *Curr. Biol.* 5:589-595.

Gilmore, R. 1993. Protein translocation across the endoplasmic reticulum: A tunnel with toll booths at entry and exit. *Cell* 75:589-692.

Griffiths, G. 1993. The immunofluorescent era of membrane traffic. *Cell Biol.* 3:214-219.

Griffiths, G. 1994. The bulk flow hypothesis *not* quite the end. *Trends Cell Biol.* 5:64-68.

Hart, G.W. 1992. Glycosylation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:1017-1023.

Helenius, T. y cols. 1992. The endoplasmic reticulum as a protein folding compartment. *Trends Cell Biol.* 2:227-231.

Hoekstra, D. ed. 1994. Cell lipids. *Curr. Topics Membs.* 40:453-623.

Hopkins, C.R. 1992. Selective membrane protein trafficking: Vectorial flow and filter. *Trends Biochem. Sci.* 17:27-32.

Lippincott-Schwartz, J. 1993. Bidirectional membrane traffic between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Trends Cell Biol.* 3:81-88.

Ludwig, T. y cols. 1995. Roles for mannose 6-phosphate receptors in lysosomal enzyme sorting. *Trends Cell Biol.* 5:202-206.

Mellman, L. ed. 1994. Membrane and sorting. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:497-567.

Novick, P. y Brennwald, P. 1993. Friends and family: The role of the Rab GTPases in vesicle traffic. *Cell* 75:597-601.

Orci, L. y cols. 1993. Coated vesicle assembly in the Golgi requires only coatamer and ARF proteins from the cytosol. *Nature* 364:732-734.

Pagano, R.E. 1990. Lipid traffic in eukaryotic cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2:652-663.

Pelham, H.R.B. y Munro, S. 1993. Sorting of membrane proteins in the secretory pathway. *Cell* 75:603-605.

Pelham, H.R.B. 1994. About turn for the COPs. *Cell* 79:1125-1127.

Pryer, N.K., Wuestehube, L.J. y Schekman, R. 1992. Vesicle-mediated protein sorting. *Ann. Rev. Biochem.* 61:471-516.

Rappaport, T.A. 1992. Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* 258:931-932.

Robinson, M.S. 1992. Adaptins. *Trends Cell Biol.* 2:293-297.

Rothman, J.E. y Orci, L. 1992. Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature* 355:409-415.

Rothman, J.E. 1994. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372:55-63.

Sabatini, D., Louvard, D. y Adesnik, M. 1993. Membranes: Editorial overview. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5(4).

Snider, M. 1992. A function for ribophorins. *Curr. Biol.* 2:43-45.

Takezawa, P.A. y Malhorta, V. 1993. Customers and SNAREs in promoting membrane traffic. *Cell* 75:593-596.

Trowbridge, I.S., Collawn, J.F. y C.R. Hopkins. 1993. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9:129-161.

van Meer, G. 1989. Lipid traffic in animal cells. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5:247-275.

Vitale, A. y Chrispeels, M.J. 1992. Sorting of proteins to the vacuoles of plant cells. *Bioess.* 14:151-159.

Walter, P. y Hognson, A.E. 1994. Signal sequence recognition and protein targeting to endoplasmic reticulum membrane. *Ann. Rev. Cell Biol.* 10:87-119.

Wolin, S.L. 1994. From the elephant to *E. coli*: SRP-dependent protein targeting. *Cell* 77:787-790.

Secreción, fusión de membranas y exocitosis

Barinaga, M. 1993. Secrets of secretion revealed. *Science* 260:487-489.

Cutler, D. 1993. Fast forward to fusion. *Nature* 364:287-288.

DeCamilli, P. Exocytosis goes with a SNAP. *Nature* 364:387-388.

Ferro-Novick, S. y Jahn, R. 1994. Vesicle fusion from yeast to man. *Nature* 370:191-193.

Monck, J.R. y Fernández, J.M. 1992. The exocytic fusion pore. *J. Cell Biol.* 119:1395-1404.

Neher, E. 1993. Secretion without fusion. *Nature* 363:497-498.

Sollner, T. y cols. 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362:318-324.

Sudhof, T.C. y cols. 1993. Membrane fusion machinery: insights from synaptic proteins. *Cell* 75:1-4.

Sztul, E.S. y cols. 1992. Targeting and fusion in vesicular transport. *Trends Cell Biol.* 2:381-386.

Warren, G. 1993. Bridging the gap. *Nature* 362:297-298.

White, J.M. 1992. Membrane fusion. *Science* 258:917-924.

Whiteheart, S.W. y Kubalek, E.W. 1995. SNAPS and NSF: General members of the fusion apparatus. *Trends Cell Biol.* 5:64-68.

Lisosomas

Hotzmann, E. 1989. *Lysosomes*. Academic Press.

Kelly, R.B. 1993. A question of endosomes. *Nature* 364:487-488.

Kornfeld, S. y Mellman, I. 1989. The biogenesis of lysosomes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 5:483-525.

Neufeld, E.F. 1991. Lysosomal storage diseases. *Ann. Rev. Biochem.* 60:257-280.

Sandoval, I.V. y Bakke, O. 1994. Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. *Trends Cell Biol.* 4:292-297.

Small, P.L.C., Ramakrishnan, L. y Falkow, S. 1994. *Science* 263:637-639.

Thoene, J.G. ed. 1992. *Pathophysiology of Lysosomal Transport*. CRC Press.

Tybulewicz, V.L.J. y cols. 1992. A model of Gaucher's disease from targeted disruption of the mouse glucocerebrosidase gene. *Nature* 357:407-410.

Fagocitosis y endocitosis

Anderson, R.G.W. 1993. Potocytosis of small molecules and ions by caveolae. *Trends Cell Biol.* 3:60-72.

Brown, M.S. 1984. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Sci. Am.* 251:58-66 (nov.).

Rabinovitch, M. y cols. 1995. Phagocytosis. *Trends Cell Biol.* 5:85-142.

Ross, R. 1993. Atherosclerosis: A defense mechanism gone awry. *Am. J. Pathol.* 143:987-1002.

Vaux, D. 1992. The structure of an endocytosis signal. *Trends Cell Biol.* 2:189-192.

Citoesqueleto y motilidad celular

9-1 Estudio del citoesqueleto

9-2 Motores moleculares

9-3 Microtúbulos

9-4 Filamentos intermedios

9-5 Microfilamentos

9-6 Contractilidad muscular

9-7 Motilidad no muscular

La vía experimental: El motor molecular que impulsa el transporte axonal rápido

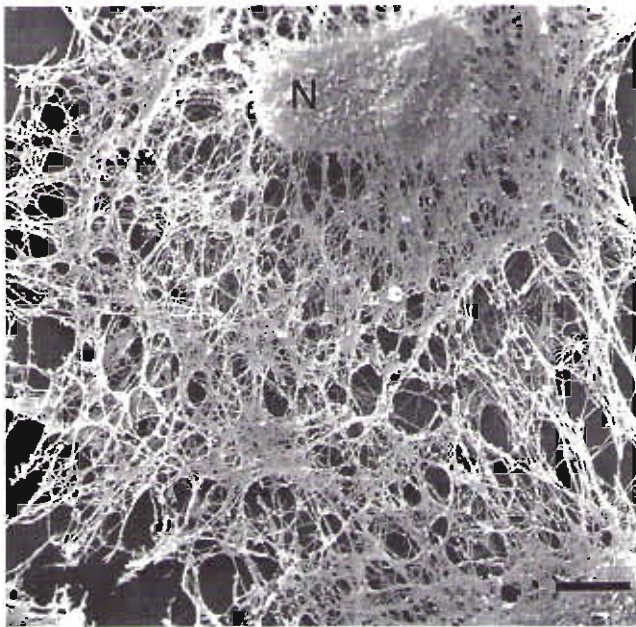


FIGURA 9-A. Extremo terminal de un axón en crecimiento de la liebre marina *Aplysia*. Los filamentos de actina requeridos para las actividades móviles de alargamiento del axón se muestran en azul; los microtúbulos, localizados atrás del extremo en crecimiento, se muestran en rojo. La fotografía es una composición de imágenes separadas de video superpuestas digitalmente. (Según P. Forscher y S.J. Smith, *J. Cell Biol.* 107:1513, 1988, con permiso de Rockefeller University Press. Cortesía de Paul Forscher, Yale University.)

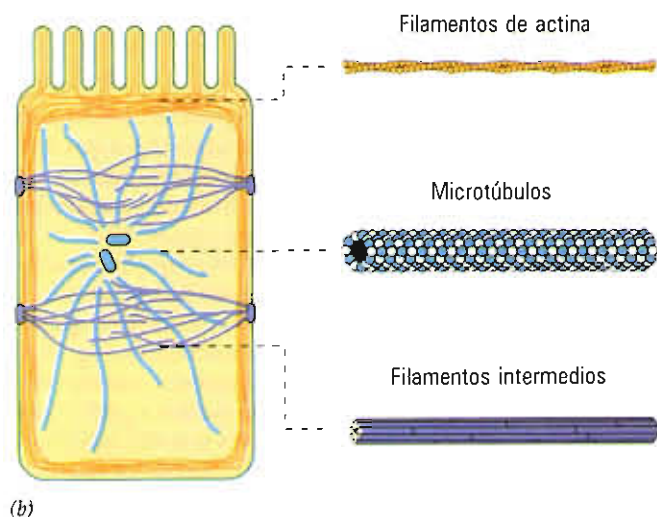
El esqueleto de un animal es un conocido sistema de órganos que consta de elementos endurecidos que apoyan a los tejidos blandos del cuerpo y desempeñan un papel clave en la mediación de los movimientos corporales. Las células también tienen un “sistema esquelético”, el **citoesqueleto**, con funciones análogas. El citoesqueleto se compone de tres estructuras filamentosas bien definidas: microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, que en conjunto forman una elaborada red interactiva (fig. 9-1). Los **microtúbulos** son estructuras cilíndricas huecas cuya pared se compone de subunidades formadas a partir de la proteína tubulina. Los **microfilamentos** son estructuras finas, sólidas, compuestas de actina. Se cree que los **filamentos intermedios** son fibras semejantes a cuerdas compuestas de varias proteínas con estructura similar.

Los elementos que constituyen el citoesqueleto funcionan en algunas actividades interrelacionadas.

- Como bastidor, que suministra apoyo estructural que ayuda a mantener la forma de las células. Por ejemplo, los eritrocitos de mamífero mantienen su forma discooidal gracias al citoesqueleto de espectrina y actina situado sobre la superficie interna de la membrana plasmática de dichas células (pág. 141)
- Como almacén interna, encargada de mantener la posición de diferentes organelos en el interior de la célula. Esta función es particularmente evidente en células epiteliales polarizadas, como la mostrada en la figura 8-8, donde los organelos se disponen siguiendo un patrón definido a lo largo de un eje que va del extremo apical al extremo basal de la célula.
- Como parte de un mecanismo necesario para el movimiento de materiales y organelos dentro de las células.



(a)



(b)

FIGURA 9-1. Componentes del citoesqueleto. a) Gammagrafía electrónica del citoesqueleto de una célula cultivada (N, núcleo). Barra, 3 μm . b) Diagrama que muestra sitios en una célula epitelial donde tienden a concentrarse cada uno de los tres principales elementos del citoesqueleto. La estructura de cada uno de los tres tipos de filamento se muestra en los recuadros. (a: Según B. Payraastre y cols. J. Cell Biol. 115:123, 1991; con permiso de Rockefeller University Press.)

Ejemplos de esta función incluyen el movimiento de las vesículas de transporte del retículo endoplásmico al complejo de Golgi; la invaginación de la membrana plasmática durante la formación de vesículas fagocitarias; la separación de los cromosomas duplicados durante la mitosis, y el movimiento de vesículas que contienen neurotransmisores a lo largo de células nerviosas desde el sitio donde se sintetizan en el cuerpo

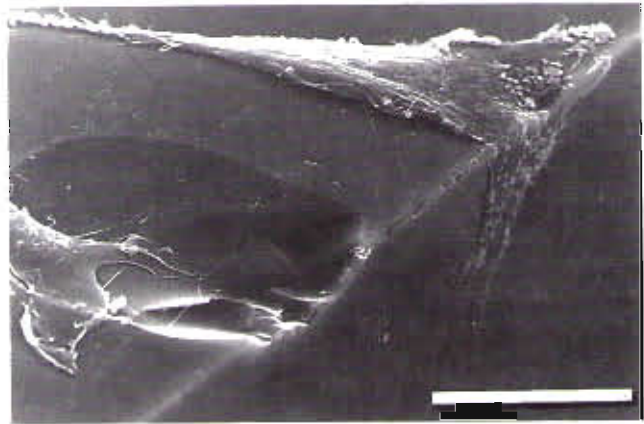


FIGURA 9-2. La flexibilidad del citoesqueleto es evidente en esta célula que se desplaza a 90° sobre el borde de un cubreobjetos. Barra, 30 μm . (Según Guenter Albrecht-Buehler, Int. Rev. Cytol. 120:211, 1990.)

celular hasta el sitio donde se utilizan en el extremo terminal de la célula.

- Como elementos generadores de fuerza encargados del movimiento de células de un sitio a otro. Los organismos unicelulares de ordinario ejecutan locomoción celular "arrastrándose" sobre la superficie de un sustrato sólido o impulsándose por sí mismos a través de su ambiente acuoso con ayuda de organelos locomotores especializados (cilios y flagelos) que sobresalen de la superficie celular. Los animales multicelulares contienen células capaces de amplios desplazamientos (fig. 9-2). Estos diferentes tipos de motilidad celular dependen de los elementos citoesqueléticos.
- Como sitios para fijar RNA mensajeros y facilitar su traducción a polipéptidos. Cuando las células se extraen con detergentes no iónicos, que dejan relativamente intacto el citoesqueleto, gran parte del mecanismo de traducción de la célula permanece en el citoesqueleto.
- Como transductor de señales. Además de la función mecánica mencionada antes, el citoesqueleto, que con frecuencia entra en contacto con la superficie interna de la membrana plasmática, desempeña un papel clave en la transmisión de señales del ambiente extracelular al interior de la célula.

Debemos recordar que aunque los componentes del citoesqueleto en las micrografías parecen estructuras estáticas e inmutables, en realidad son muy dinámicas capaces de reorganizarse con rapidez espectacular. Además, gran parte de las funciones del citoesqueleto requieren muchas proteínas accesorias que no forman parte de los propios filamentos.

9-1 Estudio del citoesqueleto

En la actualidad, el estudio del citoesqueleto es una de las áreas más activas en biología celular, en gran parte debido

al desarrollo de técnicas que permiten a los investigadores adoptar un método unificado morfológico, bioquímico y molecular. Como resultado, ahora se sabe bastante acerca de las familias de proteínas que constituyen el citoesqueleto; la organización de las subunidades dentro de sus respectivas estructuras fibrosas; los “motores moleculares” que generan las fuerzas que permiten al citoesqueleto participar en actividades de movimiento; y las cualidades dinámicas que controlan la organización espacial, ensamblado y desensamblado de los diferentes elementos del citoesqueleto. Analizaremos brevemente algunas técnicas importantes para estudiar el citoesqueleto.

Empleo del microscopio de fluorescencia

El microscopio de luz ha sido la herramienta tradicional empleada para conocer más acerca de la organización celular en tejidos fijados y teñidos, y para observar células vivientes que participen en diferentes tipos de movimiento. En los últimos dos decenios, el microscopio de luz sufrió grandes cambios que permitieron a este instrumento suministrar información acerca de estructuras celulares mucho más pequeñas que las visibles mediante técnicas ópticas estándar. La microscopía de fluorescencia (sección 17-1) ha desempeñado un papel muy importante en esta revolución.

La microscopía de preparaciones fluorescentes se ha empleado para estudiar la dinámica del citoesqueleto. Por ejemplo, las subunidades proteínicas de las estructuras del citoesqueleto (como tubulina y queratina) pueden hacerse fluorescentes mediante la formación de uniones covalentes (*conjugación*) con una proteína fluorescente de bajo peso molecular, que a continuación se introduce a la célula viviente mediante microinyección. Las subunidades se incorporan a la forma polimérica de la proteína como microtúbulo o microfilamento intermedio y se puede seguir en el tiempo el sitio donde se localiza la estructura fluorescente mientras la célula participa en sus actividades normales. Así, a diferencia de las técnicas de alta resolución, la célula permanece viva durante la observación. La figura 9-3 muestra la distribución de los microtúbulos en el axón en proceso de alargamiento de una neurona inyectada previamente con tubulina fluorescente.

La microscopía de fluorescencia también se puede usar para conocer el sitio dentro de la célula de una proteína presente en concentración muy baja. Estos experimentos se efectúan mejor utilizando anticuerpos fluorescentes capaces de enlazarse con elevada afinidad a la proteína buscada. Los anticuerpos son particularmente útiles debido a que pueden distinguir variantes relativamente cercanas (isoformas) de una proteína. La proteína puede localizarse inyectando el anticuerpo en una célula viviente, experimento que también puede revelar la función de la proteína estudiada, puesto que la unión del anticuerpo con frecuencia destruye la capacidad de la proteína para efectuar su actividad normal. Alternativamente, se puede determinar la localización de la proteína específica añadiendo el anticuerpo fluorescente a células o cortes de tejido fijados, como se ilustra en la figura 9-4. La distribución de los tres tipos de elementos citoesqueléticos: microtúbulos, filamentos inter-



5 μm

FIGURA 9-3. Distribución de los microtúbulos en un axón en proceso de alargamiento de una neurona viviente. La célula se inyectó con un pequeño volumen de tubulina cerebral unida por enlaces covalentes al colorante fluorescente rodamina. Una vez en el citoplasma, las subunidades de tubulina fluorescente se incorporan a los microtúbulos cuyas posiciones pueden ser seguidas bajo el microscopio de fluorescencia conforme las células efectúan sus actividades normales. (Según James H. Sabry y cols. J. Cell Biol. 115:383, 1991, cortesía de David Bentley; con permiso de Rockefeller University Press.)

medios, y microfilamentos, se puede revelar en la misma célula en tres imágenes sucesivas en las micrografías de la figura 9-5.

Empleo de la videomicroscopía y ensayos de motilidad *in vitro*

Otra manera de aumentar la potencia del microscopio de luz es “filmar” los sucesos observados bajo el microscopio con una cámara de video y observar la escena en una pantalla de televisión preparada para tal objetivo. La imagen capturada por una cámara de video posee un contraste excepcional y además se puede digitalizar y someter a procesos de computación. Estas características permiten observar y fotografiar objetos ordinariamente observados a baja resolución con el microscopio de luz, como los microtúbulos de 25 nm o las vesículas membranosas de 40 nm. La videomicroscopía también puede emplearse para observar *in vitro* el crecimiento o la reducción de microtúbulos individuales conforme ganan o pierden subunidades.

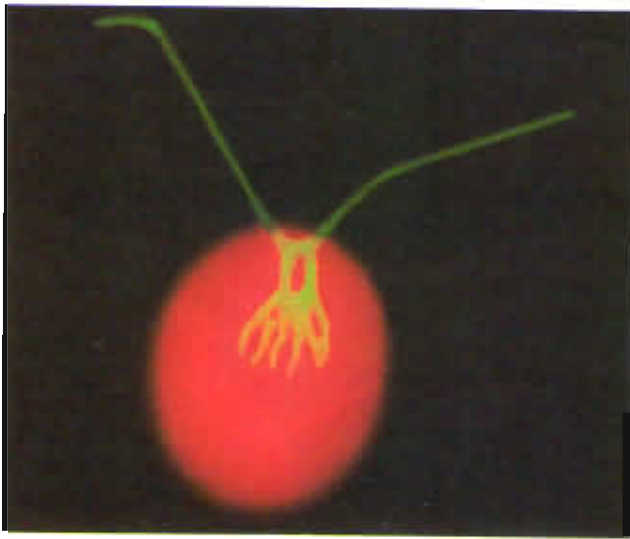


FIGURA 9-4. Localización de una proteína dentro de una célula utilizando anticuerpos fluorescentes. Esta célula de alga fue teñida con anticuerpos fluorescentes (color amarillo verdoso) dirigidos contra una proteína denominada centrina. Se observa que la centrina se localiza dentro de los flagelos de la célula y las estructuras semejantes a raíces entre el flagelo y el núcleo. El color rojo de la célula es resultado de la autofluorescencia de moléculas de clorofila de la alga fotosintética. (Según Mark A. Sanders y Jeffrey L. Salisbury, de la Clínica Mayo, en *Cell* 70:533, 1992; con permiso de Cell Press.)

El desarrollo de la videomicroscopia también condujo a desarrollar técnicas para observar movimientos generados por moléculas individuales de proteínas que actúan como "motores moleculares". Por ejemplo, en un tipo de ensayo, primero se permite a los microtúbulos fijarse a un cubreobjetos

de vidrio; a continuación, los microtúbulos se cubren directamente con microscópicos globulitos empleando un sistema de rayos laser enfocados que actúan como "tenazas ópticas", que contienen en su superficie una sola o unas cuantas moléculas de proteína motora. En condiciones apropiadas, empleando ATP como fuente de energía, se pueden seguir el movimiento de un globulito a lo largo del microtúbulo sobre la pantalla de televisión (fig. 9-6). Los rayos laser enfocados también se pueden utilizar para "atrapar" un solo globulito y medir las diminutas fuerzas (medidas en piconewtons, pN) generadas por una sola proteína motora cuando "intenta" mover al globulito contra la fuerza ejercida por la trampa óptica. Las fuerzas y los desplazamientos medidos en estos ensayos son tan pequeños y los instrumentos tan sensibles a la vibración, que un grupo de investigadores registró sus mejores medidas después de la 1:00 a.m., cuando el sistema de transporte subterráneo (METRO) de la ciudad estaba detenido.

Empleo de técnicas de microscopia electrónica

Una de las propiedades más características del citoesqueleto es su insolubilidad en detergentes no iónicos, como el tritón X-100. Cuando se tratan las células con estos detergentes se extraen los materiales solubles y membranosos, y dejan el puro citoesqueleto casi en la misma condición y disposición que se encuentra en la célula viviente. Una de las mejores técnicas para visualizar el citoesqueleto de las células tratadas con detergente es liberar las células, eliminar el agua que la rodea mediante sublimación al "agua fuerte" profundo (fig. 4-19), y a continuación utilizar las fibras citoesqueléticas expuestas como moldes para formar réplicas de platino que puedan visualizarse con el microscopio electrónico. Según se ilustra en la figura 9-7, esta técnica propor-

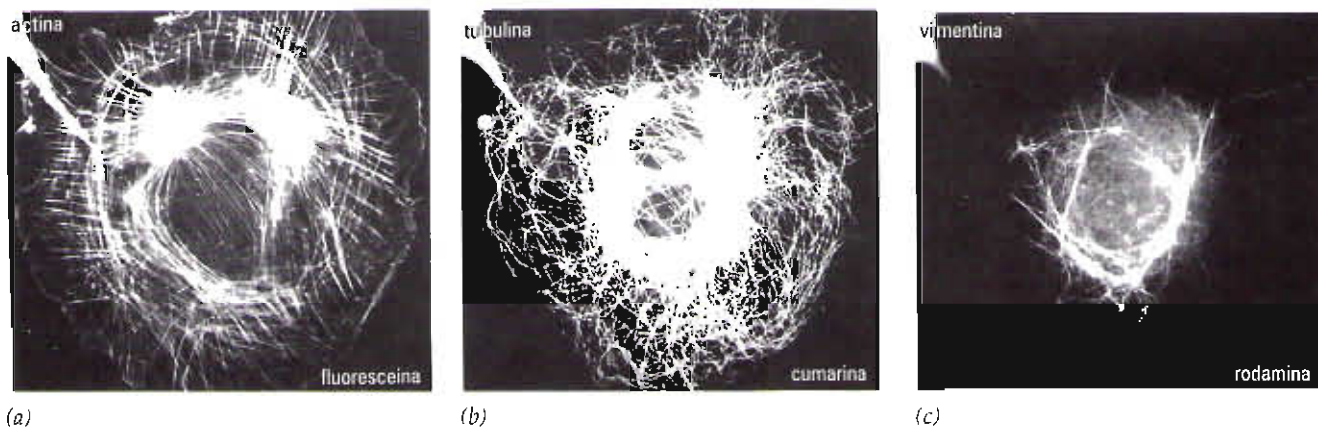


FIGURA 9-5. Localización por medio de fluorescencia de los microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios en la misma célula. Este fibroblasto fue coloreado con tres diferentes sondas fluorescentes que se unen a los tres diferentes tipos de elementos citoesqueléticos. *a)* Los filamentos que contienen actina fueron marcados con la toxina de hongos faloidina; *b)* los microtúbulos que contienen tubulina se marcaron con anticuerpos antitubulina, y *c)* los filamentos intermedios se marcaron con anticuerpos antivimentina. El conjugado fluorescente utilizado en cada caso se indica en el ángulo inferior derecho de cada fotografía. Cada uno de estos colorantes fluorescentes emite luz de diferente longitud de onda. Por consiguiente, se puede localizar cada uno en la célula utilizando filtros que bloquean la luz emitida por los otros dos compuestos fluorescentes. (Según Monika Herzog y cols., cortesía de Victor Small, *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, J.E. Celis, ed., Academic Press, 1994.)

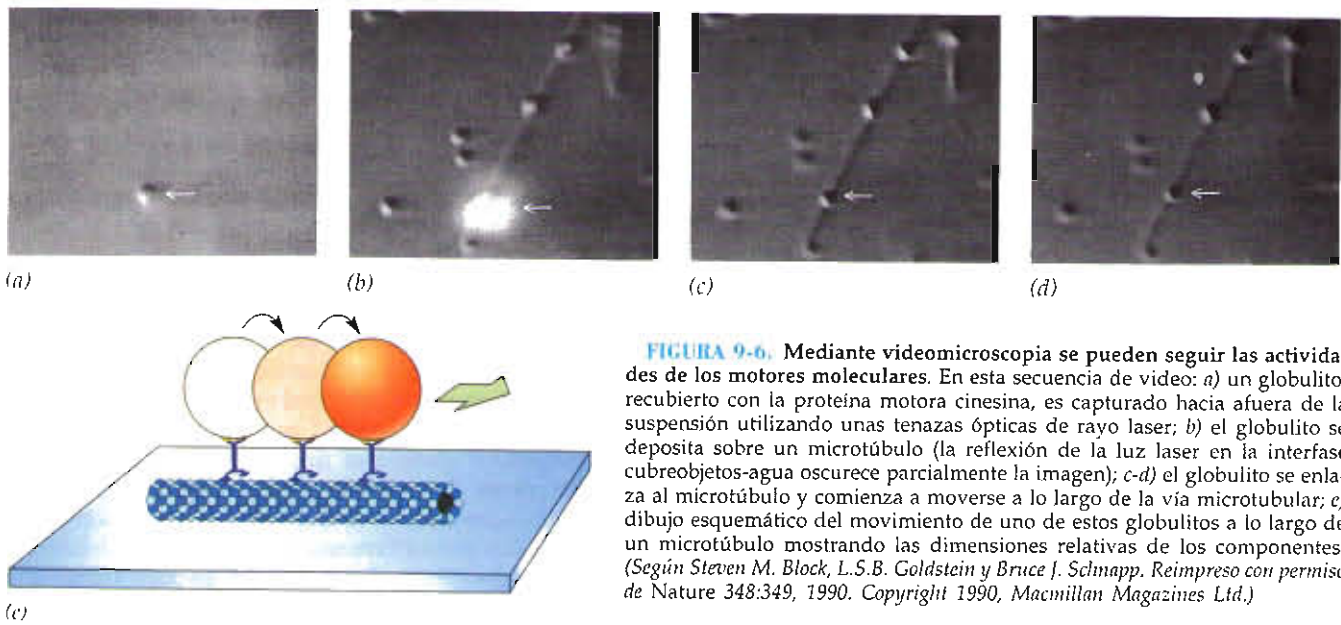
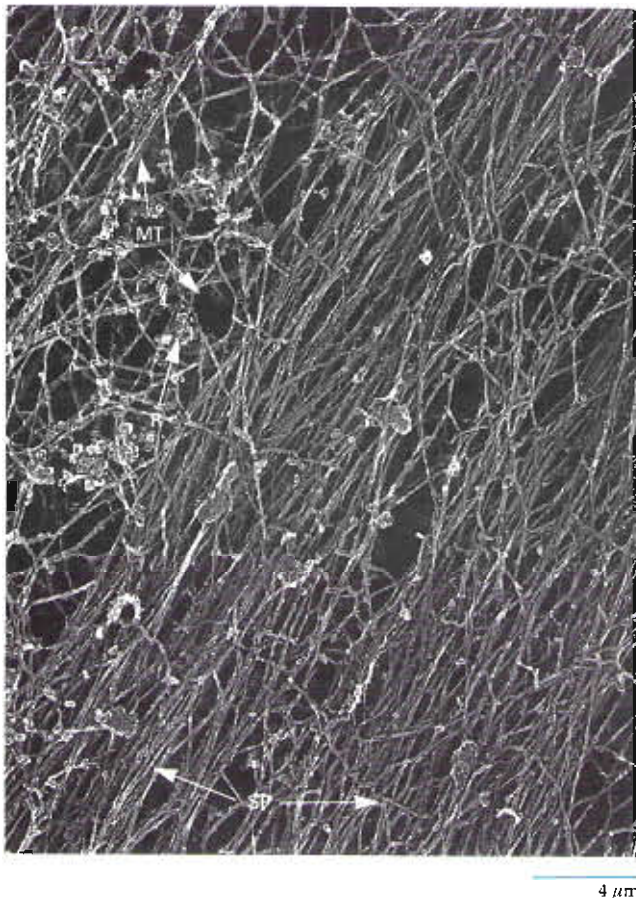


FIGURA 9-6. Mediante videomicroscopía se pueden seguir las actividades de los motores moleculares. En esta secuencia de video: *a*) un globulito, recubierto con la proteína motora kinesina, es capturado hacia afuera de la suspensión utilizando unas tenazas ópticas de rayo laser; *b*) el globulito se deposita sobre un microtúbulo (la reflexión de la luz laser en la interfase cubreobjetos-agua oscurece parcialmente la imagen); *c-d*) el globulito se enlaza al microtúbulo y comienza a moverse a lo largo de la vía microtubular; *e*) dibujo esquemático del movimiento de uno de estos globulitos a lo largo de un microtúbulo mostrando las dimensiones relativas de los componentes. (Según Steven M. Block, L.S.B. Goldstein y Bruce J. Schnapp. Reimpreso con permiso de Nature 348:349, 1990. Copyright 1990, Macmillan Magazines Ltd.)

cional vistas tridimensionales espectaculares del citoesqueleto, con resolución lo bastante alta para identificar elementos específicos simplemente según su diámetro y la morfo-

logía de su superficie. Se puede incrementar el contenido de información de la preparación tratándola con anticuerpos específicos antes del sombreado metálico, y después observar los complejos antígeno-anticuerpo en las réplicas con la resolución lograda en las mismas.



9-2 Motores moleculares

Los motores son máquinas que convierten energía química o eléctrica en energía mecánica. Por ejemplo, el motor de un automóvil convierte la energía química de la gasolina en energía mecánica, poniendo a girar el eje delantero o el trasero que arrastra a las ruedas en su rotación. Los motores diseñados por el hombre son muy variados y sirven para efectuar todo tipo de trabajo mecánico. Consideremos un motor del tipo mostrado en la figura 9-8, el cual, de manera no muy diferente a la locomotora de un tren, se desplaza tirando de su carga a lo largo de rieles. A diferencia de la locomotora típica, este motor genera su fuerza mediante un brazo oscilante que se enlaza sucesivamente a sitios inmóviles sobre el riel. El brazo se balancea hacia adelante y se enlaza a un sitio sobre el riel, el cual activa al motor para efectuar su golpe de potencia durante el cual el brazo se desplaza hacia atrás impulsando el motor con su carga hacia adelante a lo largo del riel. Luego de concluir el golpe de

FIGURA 9-7. Examen con microscopio electrónico del citoesqueleto. Réplica metálica del citoesqueleto congelado en seco de un fibroblasto extraído con el detergente no iónico Triton X-100. Son evidentes los haces de microfilamentos (marcados SF por fibras de esfuerzo, que se analizan posteriormente en el capítulo). También se observan dos estructuras más gruesas que pueden ser microtúbulos (MT), y una red más difusa de filamentos tachonada de grupos como racimos de uvas que tienen el tamaño y la forma de los polirribosomas (R). (Según John E. Heuser y Marc W. Kirschner, J. Cell Biol. 86:215, 1980; con permiso de Rockefeller University Press.)

potencia, el brazo se separa de su sitio de enlace y se regresa mediante un golpe de recuperación. El brazo entonces vuelve a fijarse a otro sitio de enlace sobre el riel, el cual una vez más desencadena el golpe de potencia.

Los motores moleculares que operan en coordinación con el citoesqueleto comparten ciertas propiedades con este tipo de motor. En los últimos 10 años, aproximadamente, se han descubierto numerosas proteínas motoras, de las cuales casi todas pueden agruparse en tres familias muy amplias: miosinas, cinesinas y dineínas. En las siguientes páginas analizaremos cada uno de los tipos de proteínas motoras, pero antes debemos indicar algunos conceptos generales.

Dos de las familias de proteínas, cinesinas y dineínas, se mueven a lo largo de vías que consisten en microtúbulos, en tanto que las miosinas se desplazan a lo largo de vías formadas por microfilamentos. No se conocen proteínas motoras que utilicen filamentos intermedios como vías. Las proteínas motoras del citoesqueleto son transductores mecano-químicos; o sea, convierten la energía química (almacenada en el ATP) en energía mecánica que se emplea para desplazar las cargas celulares fijas al motor. Los tipos de carga celular incluyen vesículas, mitocondrias, lisosomas, cromosomas y otros filamentos citoesqueléticos.

Se cree que las proteínas motoras se mueven gradualmente en una sola dirección a lo largo de la vía citoesquelética de un sitio a otro, de manera no muy diferente al motor mostrado en la figura 9-8. Conforme la proteína se desplaza a lo largo de la vía, sufre una serie de cambios de conformación que constituyen un ciclo mecánico. Los pasos del ciclo mecánico se acoplan a los pasos del ciclo químico, el cual proporciona la energía necesaria que actúa como combustible del movimiento. Los pasos del ciclo químico incluyen: enlace de la molécula de ATP al motor, hidrólisis del ATP para formar ADP y P_i , liberación de los productos del motor, y enlace de una nueva molécula de ATP. Conforme la proteína motora se mueve a sitios sucesivos a lo largo de los polímeros citoesqueléticos, se repiten una y otra vez los ciclos químico y mecánico, arrastrando la carga sobre distancias tan grandes como toda la longitud de un microtúbulo. A medida que los investigadores conocieron más detalles de la estructura de los motores moleculares y observaron la conducta *in vitro* de proteínas motoras individuales, surgió un cuadro detallado de la motilidad del citoesqueleto.

9-3 Microtúbulos

Estructura y composición

Como su nombre indica, los microtúbulos son estructuras cilíndricas huecas que ocurren en casi toda célula eucariota observada con el microscopio electrónico. Los microtúbulos son elementos con diversa disposición de estructuras además del citoesqueleto, las cuales incluyen el huso mitótico de las células en división y el núcleo central de cilios y flagelos. Los microtúbulos tienen diámetro externo de 24 nm, una pared cuyo espesor es de unos 5 nm y longitud que puede extenderse a todo lo largo o ancho de una célula. Un examen ultraestructural cuidadoso de los microtúbulos muestra que su pared es un polímero compuesto de subunidades globulares (fig. 9-9, a). Cada subunidad globular consta de una sola molécula de la proteína **tubulina**. Las subunidades se disponen en hileras longitudinales llamadas **protofilamentos**, alineados paralelamente al eje mayor del túbulo (fig. 9-9, a). En un corte transversal se nota que los microtúbulos casi siempre contienen 13 subunidades que rodean la circunferencia de la pared (fig. 9-9, b).

Aunque la pared del microtúbulo parece estar formada por subunidades globulares, el ensamble de los microtúbulos ocurre por incorporación de bloques de construcción dimericos. Cada uno de estos bloques es una unidad que consta de dos moléculas ensambladas de tubulina, una α -tubulina y una β -tubulina (fig. 9-9, c,d). Cada unidad contiene dos componentes no idénticos (un heterodímero), por lo que el protofilamento íntegro presenta una estructura asimétrica con una α -tubulina en un extremo y una β -tubulina en el otro. Todos los protofilamentos de un microtúbulo tienen la misma polaridad. Cuando un polímero se forma de componentes asimétricos, todos orientados en la misma dirección (es decir, cabeza con cola) a lo largo del eje ($\alpha\beta, \alpha\beta, \dots, \alpha\beta, \alpha\beta$), entonces el polímero en sí es una estructura polarizada con un extremo (que contiene moléculas β -tubulina) distinguible del otro extremo (que contiene moléculas α -tubulina). Un extremo del microtúbulo se conoce como **extremo más** y el otro como **extremo menos**. Como estudiaremos más adelante en este capítulo, la polaridad estructural de los microtúbulos es un factor importante en el ensamble de

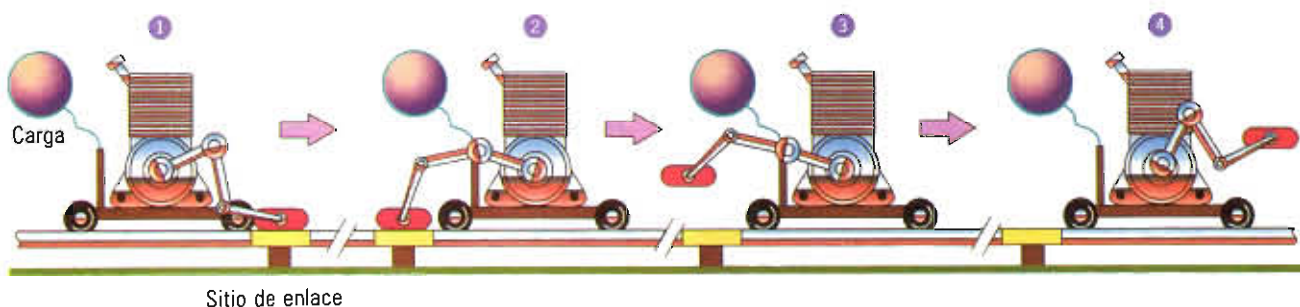


FIGURA 9-8. Motores moleculares que se cree que funcionan de manera análoga a la hipotética estructura que arrastra la carga aquí mostrada. Durante un ciclo sencillo de actividad mecánica, el motor se fija a un sitio de enlace sobre su vía (paso 1), sufre un golpe de potencia que desplaza el motor a lo largo de la vía (paso 2), se desprende de su sitio de enlace (paso 3) y retorna a su posición original (paso 4). Se cree que ocurre un ciclo de actividad similar, vinculado al ciclo químico que implica el enlace e hidrólisis de ATP, que ocurre conforme los motores biológicos se desplazan a lo largo de sus vías citoesqueléticas arrastrando varios tipos de carga celular.

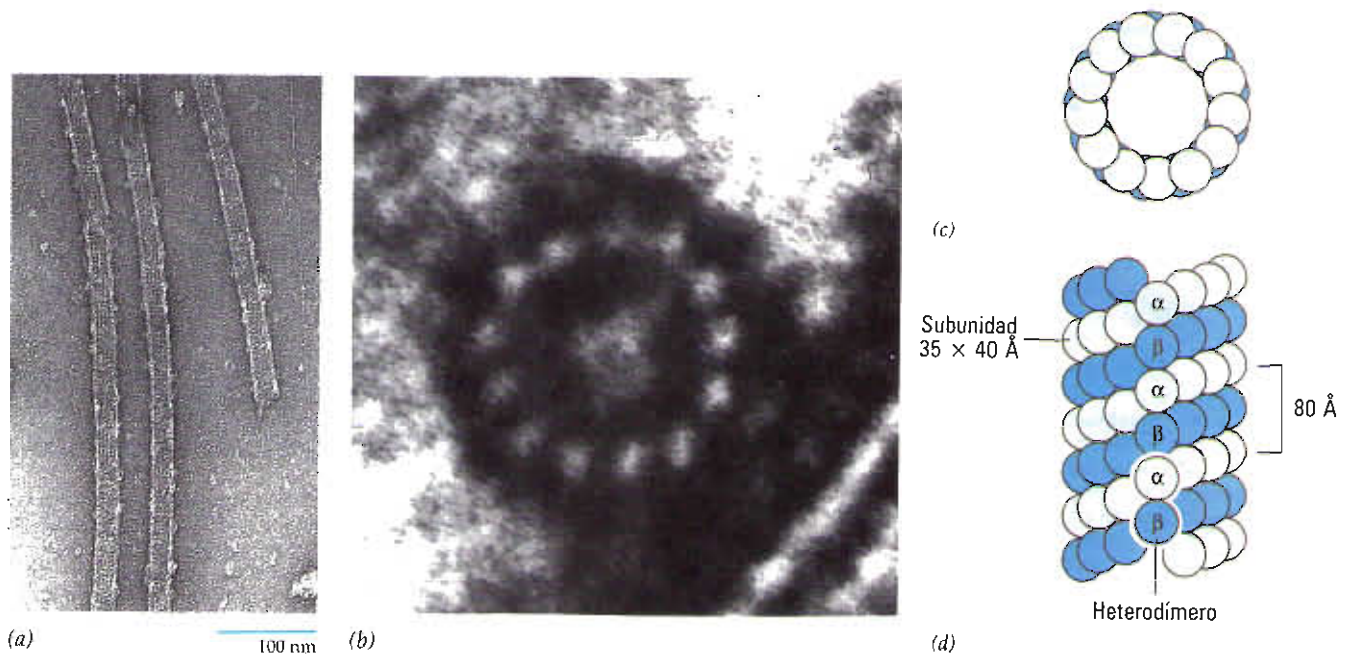


FIGURA 9-9. Estructura de los microtúbulos. *a)* Micrografía electrónica de microtúbulos del cerebro teñidos en negativo que muestran las subunidades globulares que constituyen los protofilamentos. Las prolongaciones en la superficie de los microtúbulos son proteínas relacionadas con el microtúbulo (PRM), analizadas más adelante. *b)* Micrografía electrónica de una sección transversa a través de un microtúbulo de una célula del extremo de la raíz de un *Juniperus* revelando las 13 subunidades dispuestas en la pared del organelo. Los microtúbulos de estas células vegetales abundan más en la zona cortical, casi de 100 nm de espesor justo por debajo de la membrana plasmática (véase en la parte inferior derecha de la micrografía). *c-d)* Diagramas de una sección transversal y una sección longitudinal de un microtúbulo. El modelo muestra 13 protofilamentos compuestos de heterodímeros α/β -tubulina. (*a:* Según Linda A. Amos, J. Cell Biol. 72:645, 1977; con permiso de Rockefeller University Press; *b:* reimpreso con permiso de Myron C. Ledbetter, J. Agt. Food Chem 13:406, 1965. Copyright 1965 American Chemical Society.)

estos organelos y de su capacidad para participar en actividades mecánicas dirigidas.

Proteínas relacionadas con microtúbulos

Los microtúbulos pueden formarse *in vitro* a partir de preparaciones purificadas de tubulina, pero los microtúbulos obtenidos de células de ordinario contienen proteínas adicionales denominadas **proteínas relacionadas con microtúbulos (PRM)**. La mayor parte de las PRM que se han identificado sólo se observan en el tejido cerebral, pero una de estas proteínas, denominada PRM4, tiene amplia distribución (cuadro 9-1).

Con el microscopio electrónico se puede observar que algunas PRM tienen una porción globular (o "cabeza") que se fija al lado del microtúbulo, y una porción filamentosa (o "cola") que se extiende hacia afuera a partir de la superficie del microtúbulo. En la figura 9-10 se muestra el enlace de una PRM2 a la superficie de un microtúbulo. Las PRM pueden interconectar microtúbulos para formar haces visibles como puentes transversales que conectan a los microtúbulos entre sí. Otras PRM a veces incrementan la estabilidad de los microtúbulos, alteran su rigidez o influyen en su velocidad de ensamblado. La actividad de las diferentes PRM es controlada principalmente por adición y eliminación de grupos fosfato por proteincinasas en un residuo particular de aminoácido.

Función

Los microtúbulos desempeñan diferentes tareas:

1. Sirven como esqueleto interno o armazón que proporciona apoyo estructural y ayuda a mantener la posición de los organelos citoplásmicos.
2. Forman parte del mecanismo que desplaza materiales y organelos de una parte a otra de la célula.

CUADRO 9-1. Proteínas relacionadas con microtúbulos

Proteínas	Peso molecular (kD)	Fuente
PRM1A	350	Tejido nervioso
PRM1B (PRM5)	325	Tejido nervioso
Vesiquina	295	Tejido nervioso
PRM2A, PRM2B	270	Tejido nervioso
PRM4	200	Ampliamente distribuido
PRM3	180	Ampliamente distribuido
Dinamina	100	Tejido nervioso
PRM2C	70	Tejido nervioso
tau	50-65	Tejido nervioso

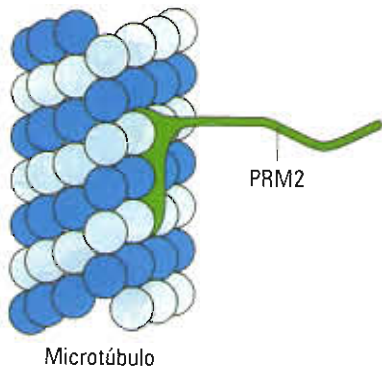


FIGURA 9-10. Proteínas relacionadas con microtúbulos (PRM). Diagrama de una molécula PRM2 enlazada a la superficie de un microtúbulo. Cada molécula PRM2 contiene tres sitios de enlace a tubulina conectada por cortos segmentos de la cadena polipeptídica. Los sitios de enlace están espaciados a una distancia suficiente para permitir que la molécula de PRM2 se una a tres subunidades separadas de tubulina en la pared del microtúbulo. Las colas de las moléculas PRM se proyectan hacia afuera, donde pueden interactuar con otros componentes celulares.

3. Son elementos móviles de cilios y flagelos.
4. Son componentes primarios del mecanismo encargado de la mitosis y la meiosis.

En las siguientes páginas consideraremos las tres primeras funciones de los microtúbulos; el papel de los microtúbulos en la división nuclear se analiza en el capítulo 14.

Microtúbulos como apoyos estructurales

Los microtúbulos son lo bastante rígidos para resistir fuerzas de compresión o de tracción sobre la fibra. Esta propiedad permite a los microtúbulos suministrar apoyo mecánico de manera no muy diferente a como las vigas de acero apoyan un alto edificio de oficinas. Por ejemplo, los microtúbulos evitan que las contracciones del citoplasma deformen las células. La distribución de los microtúbulos citoplásmicos en una célula por lo general define la morfología de la misma. Las células animales cultivadas de ordinario se dispersan sobre el sustrato adoptando una forma esférica aplanada, y los microtúbulos se extienden en disposición radial hacia afuera de la región que rodea al núcleo (fig. 9-11). En contraste, los microtúbulos de células epiteliales columnares por lo general se orientan con su eje mayor paralelo al eje longitudinal de la célula (fig. 9-12). Gracias a esta configuración, el microtúbulo al parecer apoya la forma polarizada de la célula de igual manera que la forma en que las varillas de aluminio apoyan la concavidad de una tienda.

A veces es difícil demostrar el papel de los microtúbulos en la conservación de la morfología de una célula íntegra, pero su papel como elemento "esquelético" se manifiesta con claridad cuando se examinan ciertas prolongaciones celulares muy alargadas, más notable en axones neuronales y en axópodos de protozoarios heliozoan.

El axón de una célula nerviosa está lleno de microtúbulos orientados paralelamente entre sí y con respecto

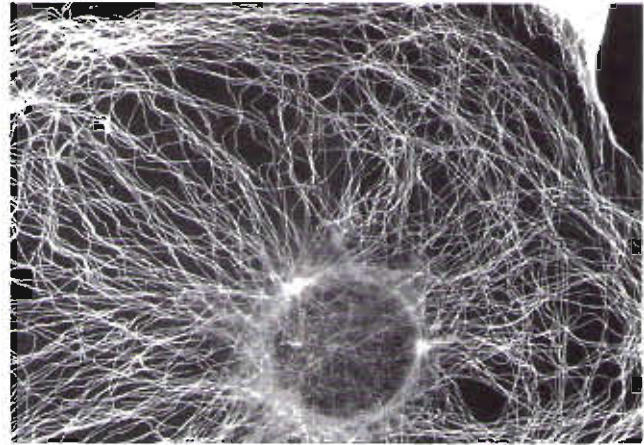


FIGURA 9-11. Localización de los microtúbulos en una célula cultivada de ratón, grande y aplanada, revelada por anticuerpos fluorescentes antitubulina. Se observa que los microtúbulos se extienden desde la región perinuclear de la célula en disposición radial; se pueden seguir los microtúbulos individuales y se observa que se incurvan gradualmente a medida que constituyen la forma de la célula. (Según Mary Osborn y Klaus Weber, *Cell* 12:563, 1977; con permiso de Cell Press.)

del eje longitudinal del mismo (fig. 9-13). En axones maduros, estos microtúbulos sirven principalmente para desplazar vesículas y otras partículas citoplásmicas a lo largo del axón (pág. 380). En el desarrollo del embrión, los microtúbulos desempeñan un papel clave para mantener la forma del axón conforme crece lentamente, extendiéndose por fuera del sistema nervioso central al interior de los tejidos embrionarios periféricos. En un cultivo de células se puede observar un proceso similar de crecimiento axonal hacia afuera. Cuando una neurona cuyo axón está en crecimiento se trata con fármacos fragmentadores de microtúbulos, como nocodazol o colchicina, la prolongación axonal deja de crecer y de ordinario se retrae hacia atrás retornando hacia el cuerpo celular.

Un ejemplo notable del papel de los microtúbulos en el mantenimiento de la forma celular es la prominencia delgada y alargada del axópodo de los protozoarios heliozoan (fig. 9-14). Cada axópodo contiene una estructura central compuesta de numerosos microtúbulos dispuestos en espiral con microtúbulos individuales que abarcan toda la longitud de la prominencia.

En las células vegetales, los microtúbulos desempeñan un papel indirecto en la conservación de la morfología celular mediante su influencia en la elaboración de la pared celular. En una célula vegetal, la masa de microtúbulos de ordinario se localiza justo por debajo de la membrana plasmática (fig. 9-9, b) formando una zona cortical distinta. Los microtúbulos de esta zona cortical influyen en la posición de las enzimas sintetizadoras de celulosa localizadas en la membrana plasmática (fig. 7-35). En consecuencia, las enzimas producen microfibrillas de celulosa orientadas paralelamente respecto de los microtúbulos subyacentes (fig. 9-15). Por su parte, la orientación de las microfibrillas de celulosa en la pared desempeña un papel importante para definir las

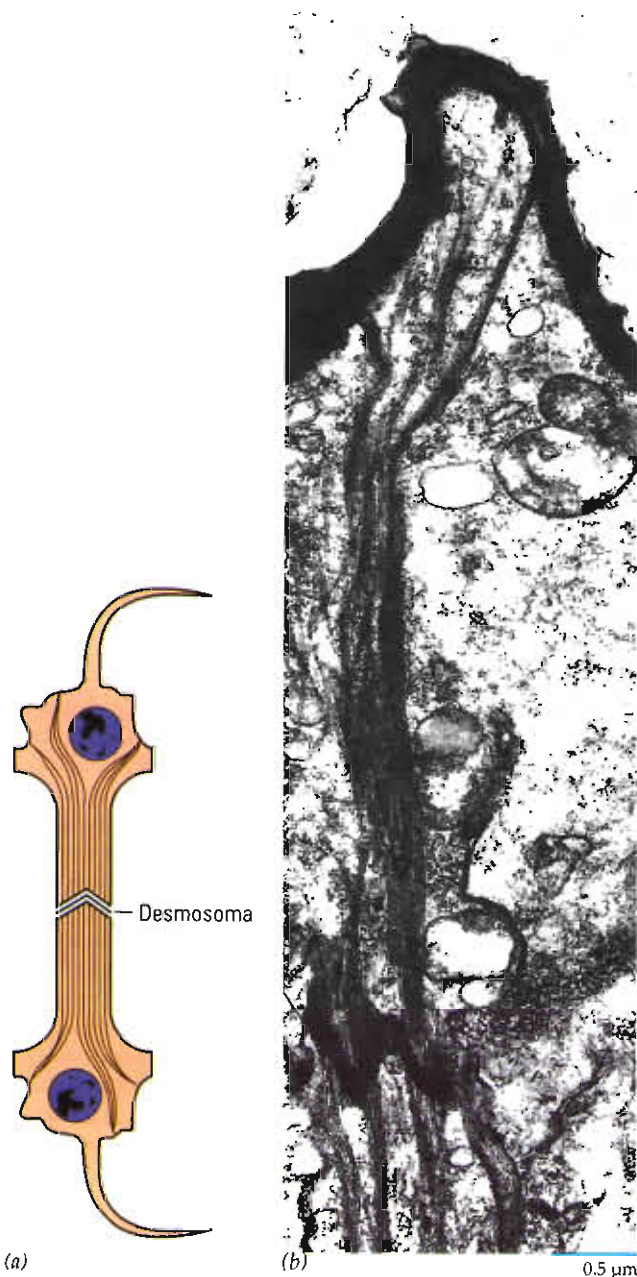


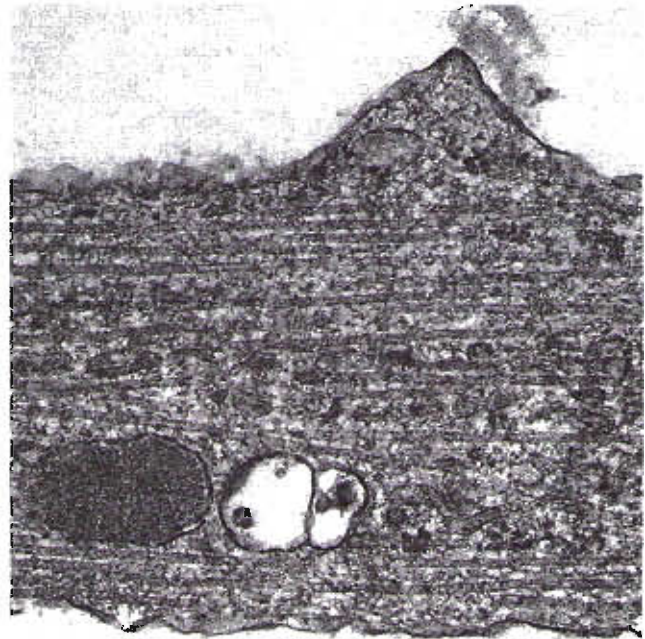
FIGURA 9-12. Disposición de los microtúbulos. Dibujo esquemático (a) y micrografía electrónica (b) de los microtúbulos en las células del ala de un insecto. La orientación de los microtúbulos da lugar a la forma alargada de la célula. (Según John B. Tucker y cols. *Eur. J. Cell Biol.* 41:281-284, 1986.)

características de crecimiento de la célula, y por lo tanto de su morfología.

También se cree que los microtúbulos participan en el mantenimiento de la organización interna de la célula. El tratamiento de la célula con fármacos fragmentadores de microtúbulos puede afectar gravemente la ubicación de los organelos membranosos, en particular del complejo de Golgi. El complejo de Golgi casi siempre se localiza cerca del cen-



(a)



(b)

0.25 μm

FIGURA 9-13. Microtúbulos de un axón y su papel en el movimiento del organelo. a) Micrografía de una neurona viva aislada de pollo. b) Micrografía electrónica de una porción de la misma célula mostrada en a (el cuadro indica la cobertura de la ME). La partícula localizada en esta área de la micrografía de luz se mantuvo en movimiento hasta el momento de la fijación. La micrografía electrónica revela que la partícula corresponde a un lisosoma. El gran número de microtúbulos paralelos desempeña un papel importante en este tipo de movimientos. (Según A.C. Breuer, C.N. Christian, M. Henkart y P.G. Nelson, *J. Cell Biol.* 65:568, 1965, con permiso de Rockefeller University Press.)

tro de la célula, justo fuera del núcleo. El tratamiento de la célula con nocodazol o colquicina puede dispersar los elementos de Golgi hacia las regiones periféricas de la célula. Cuando se elimina el fármaco y los microtúbulos vuelven a ensamblarse, las membranas de Golgi regresan al centro de la célula.

Microtúbulos como agentes de motilidad intracelular

Las células vivientes muestran intensa actividad conforme las macromoléculas y los organelos se desplazan dirigiéndose de un sitio a otro. Con el microscopio de luz se puede apreciar este "ir y venir" de partículas materiales dentro de una célula viviente, pero el proceso subyacente rara vez resulta fácil de estudiar por la falta de un citoesqueleto alta-

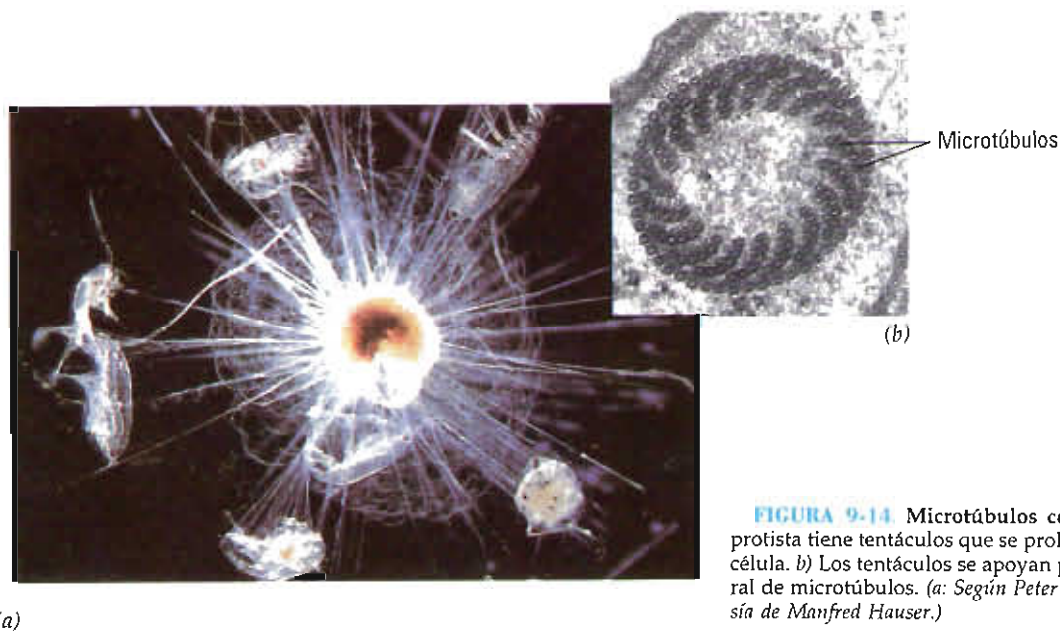


FIGURA 9-14. Microtúbulos como barras de apoyo. *a)* Este protista tiene tentáculos que se prolongan a partir del cuerpo de la célula. *b)* Los tentáculos se apoyan por elaborada disposición espiral de microtúbulos. (*a:* Según Peter Parks/Animals Animals; *b:* cortesía de Manfred Hauser.)

mente ordenado en la mayor parte de los tipos de célula. Por ejemplo, se sabe que el transporte de vesículas de un compartimiento de la membrana a otro depende de la presencia de microtúbulos, porque la interrupción de estos elementos citoesqueléticos con frecuencia detiene el movimiento.

En los estudios que proporcionan más información acerca de los movimientos de organelos se utilizaron

1. Células como neuronas o células pigmentadas cuyos movimientos intracelulares se basan en haces regularmente ordenados de microtúbulos.
2. Sistemas *in vitro* donde pueden reconstituirse movimientos basados en microtúbulos fuera de la célula viviente.

Transporte axonal. El axón de una motoneurona individual puede extenderse desde la médula espinal hasta la punta de los dedos de la mano o del pie. El centro que

controla esta neurona es su cuerpo celular, una porción esférica de la célula que reside en la porción ventral de la médula espinal. El cuerpo de la célula contiene al núcleo, al retículo endoplásmico, al complejo de Golgi y a otros organelos necesarios para sintetizar y procesar proteínas y otras moléculas. Cuando se inyectan aminoácidos marcados dentro del cuerpo celular, se incorporan a proteínas marcadas que se desplazan al interior del axón y recorren gradualmente toda su longitud. La mayor parte de los materiales, como las moléculas de neurotransmisor empleadas en la transmisión sináptica en el extremo terminal de la neurona, se encuentran separados en compartimientos dentro de vesículas membranosas en el RE y el complejo de Golgi, y luego se transportan a lo largo del axón (fig. 9-16, *a*). Diferentes materiales se desplazan a distintas velocidades; el transporte axonal más rápido alcanza una velocidad de hasta $5\ \mu\text{m}$ por segundo (400 mm por día). Se dice que las estruc-

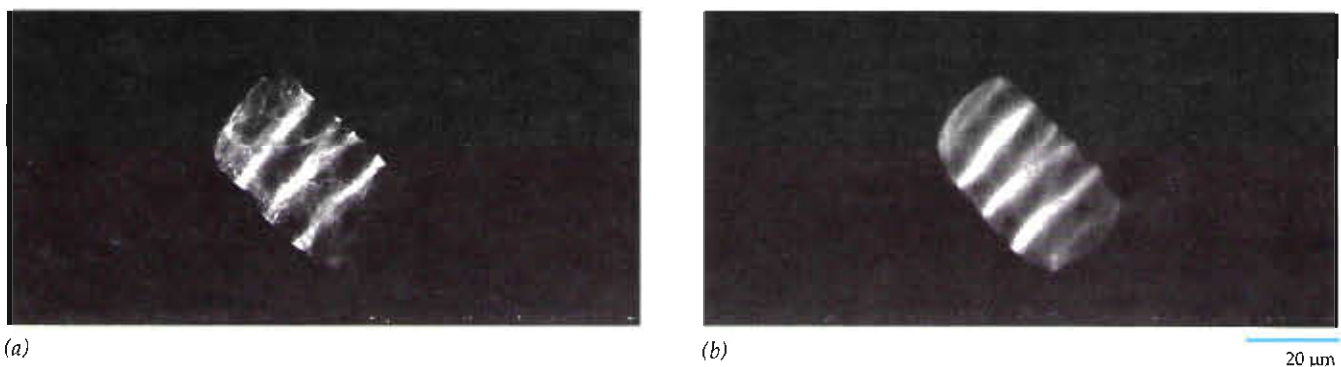


FIGURA 9-15. Relaciones espaciales entre la orientación de los microtúbulos y el depósito de celulosa en células vegetales. Células mesófilas de trigo que fueron coloreadas con doble colorante para microtúbulos (*a*) y celulosa de la pared celular (*b*). Es evidente que los microtúbulos corticales y las microfibrillas de celulosa están coalineados. (Según Georg Jung y Wolfgang Wernicke, *Protoplasma* 53:145, 1990.)

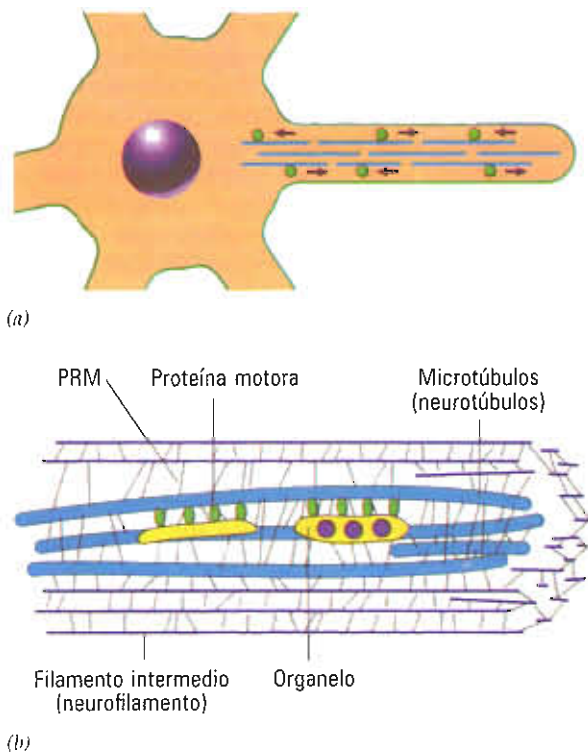


FIGURA 9-16. Transporte axonal. *a)* Dibujo esquemático de una célula nerviosa que muestra el movimiento de vesículas a lo largo del axón siguiendo las vías de los microtúbulos. Las vesículas se mueven en ambas direcciones dentro del axón. *b)* Dibujo esquemático de la organización de los microtúbulos y los filamentos intermedios (neurofilamentos) dentro de un axón. Las vesículas que contienen materiales transportados se unen a los microtúbulos mediante proteínas de unión transversa, incluyendo proteínas motoras como la kinesina y la dineína.

turas y materiales que viajan desde el cuerpo celular hacia el extremo de la neurona se mueven en dirección *anterógrada*. Otras estructuras, incluyendo vesículas endocíticas formadas en el axón terminal que transportan factores reguladores de células específicas, se mueven en dirección opuesta o *retrógrada*, desde la sinapsis hacia el cuerpo celular.

Los axones están llenos de estructuras citoesqueléticas, incluyendo haces de microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos interconectados entre sí en diferentes formas (fig. 9-16, *b*). Diversas pruebas sugieren que tanto los movimientos anterógrados como los retrógrados son mediados principalmente por microtúbulos. Mediante videomicroscopía, los investigadores pueden observar las vesículas individuales conforme se mueven a lo largo de los microtúbulos de un axón cuando se acercan o alejan del cuerpo celular (fig. 9-17). La participación de los microtúbulos se puede verificar fijando la célula y observando la misma región con el microscopio electrónico. Con esta técnica se observa que la vesícula en movimiento se encuentra en íntima relación con un microtúbulo (como en la figura 9-13). Casi toda la información respecto del mecanismo de transporte axonal y otros tipos de motilidad intracelular proviene de estudios *in vitro* utilizando componentes purificados, como se describe en la siguiente sección.

Motores microtubulares y ensayos de motilidad *in vitro*

El tema de las proteínas motoras se introdujo en la página 329. Se han aislado dos tipos de proteínas motoras encargadas de los movimientos de materiales citoplásmicos a lo largo de los microtúbulos: kinesinas y dineínas citoplásmicas.

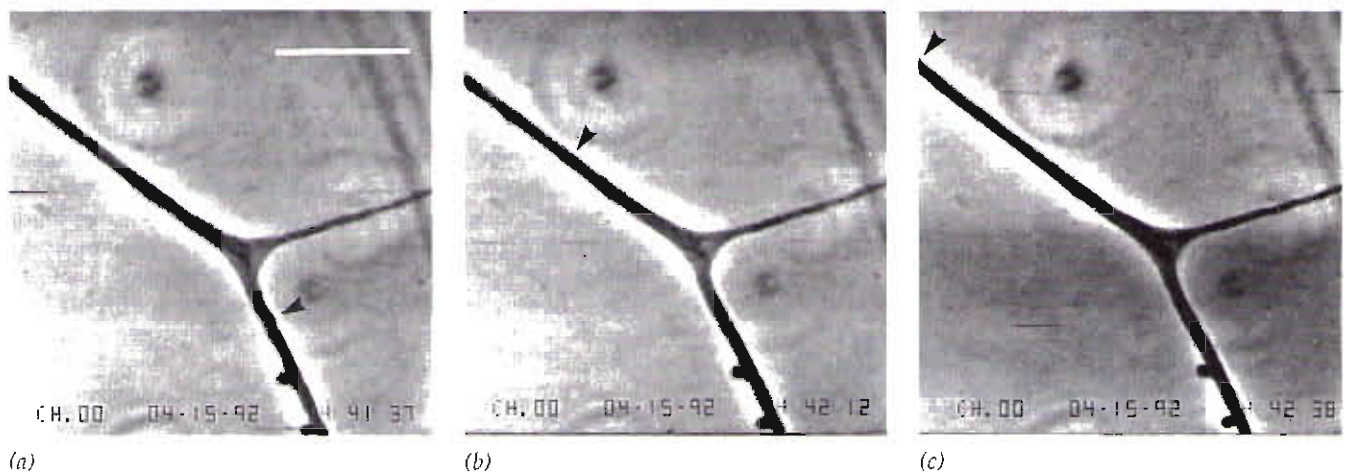


FIGURA 9-17. Visualización del transporte axonal. *a-c)* Estas videomicrografías muestran el avance de un organelo membranoso a lo largo de un axón ramificado. El cuerpo celular se encuentra alejado del campo en el extremo superior izquierdo, en tanto que el extremo terminal (conos de crecimiento, página 379) quedan fuera del campo en la parte inferior derecha. La posición del organelo se indica por las cabezas de flecha. El organelo que se está siguiendo (una vacuola autofágica) se mueve en la dirección retrógrada a través de la punta de la rama y continúa moviéndose hacia el cuerpo de la célula. Barra, 10 μm . (Según Peter J. Hollenbeck, J. Cell Biol. 121:307, 1993; con permiso de Rockefeller University Press.)

Cinesinas

En 1985 se aisló una proteína motora del axón gigante del calamar, implicada en el desplazamiento de vesículas membranosas y otros organelos desde el cuerpo celular hacia las terminales sinápticas. A esta proteína se le dio el nombre de **cinesina**. La cinesina es una proteína grande compuesta de varios dominios distintos, incluyendo un par de cabezas globulares que actúan como "motores" generadores de fuerza y una cola en forma de abanico que se enlaza a la carga que debe arrastrar (fig. 9-18, *a*). La cinesina no es más que un miembro de una superfamilia cada vez más extensa de proteínas parecidas a cinesina (PPQ). Las cabezas (o dominio motor) de las proteínas parecidas a cinesina tienen una secuencia semejante que refleja la similitud de su papel en el desplazamiento a lo largo de los microtúbulos, en tanto que las colas tienen secuencias diversas, lo que indica la variedad de cargas que estas proteínas pueden arrastrar.

Cuando se fijan moléculas purificadas de cinesina a globulitos y se observan en ensayos de motilidad *in vitro* del tipo mostrado en la figura 9-6, se ve que los globulitos se mueven a lo largo de microtúbulos individuales hacia el extremo con polaridad positiva del polímero (fig. 9-18, *b*). En otras palabras, la cinesina es un *motor microtubular dirigido*.

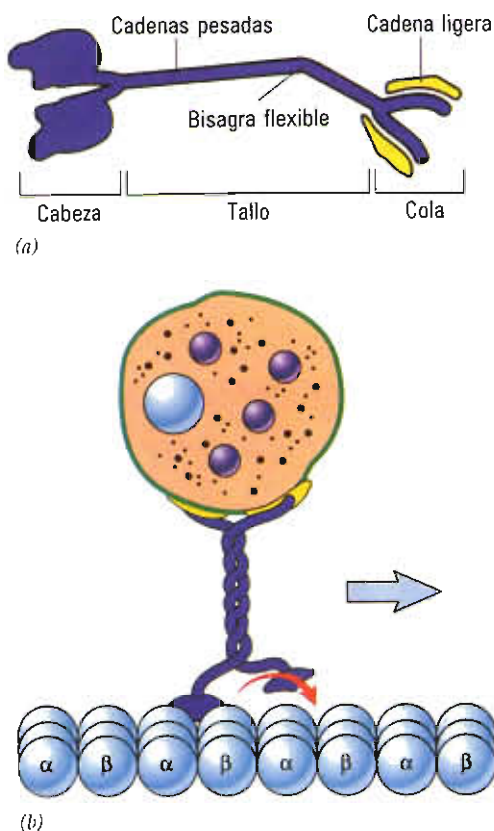


FIGURA 9-18. Cinesina. *a*) Estructura de una molécula de cinesina que consta principalmente de dos cadenas pesadas que se entrelazan en la región del tallo. Las cabezas generadoras de fuerzas se unen al microtúbulo, y la cola a la carga que se transporta. *b*) Diagrama esquemático de una molécula de cinesina moviendo una vesícula a lo largo de una vía microtubular.

do hacia el extremo más. Puesto que todos los microtúbulos de un axón se orientan con sus extremos de polaridad negativa enfrentando al cuerpo celular y sus extremos positivos enfrentando las terminales sinápticas, se presume que la cinesina se encarga del transporte axonal anterógrado. El descubrimiento de la cinesina y su papel en el transporte axonal se analiza en *La vía experimental*, al final del capítulo.

Las proteínas motoras, incluyendo cinesina, funcionan a través de un puente transversal dependiente de un ciclo de ATP. A lo largo de un protofilamento de un microtúbulo sólo se desplaza una sola molécula de cinesina con velocidad proporcional a la concentración de ATP (hasta una velocidad máxima de casi 900 nm por segundo). Si la concentración de ATP es baja, las moléculas de cinesina viajan con lentitud suficiente que permite observar que la proteína no se mueve en forma continua, sino más bien se desplaza por pasos separados (fig. 9-18, *b*). Cada paso mide casi 8 nm de longitud, que corresponde a las dimensiones de un dímero de tubulina. Por lo tanto, al parecer las moléculas de cinesina se desplazan sobre la vía microtubular avanzando cada vez sobre dos subunidades globulares (o sea un heterodímero).

Las proteínas similares a cinesina no se restringen a células nerviosas, sino que se encuentran en todos los tipos de células eucariotas. En el capítulo 8 vimos cómo las vesículas se mueven de un compartimiento membranoso a otro a lo largo de ciertas vías definidas. Las rutas seguidas por las vesículas citoplásmicas son definidas principalmente por microtúbulos (fig. 9-16, *a*) y la cinesina tiene una participación muy importante como agente generador de las fuerzas que impulsan el movimiento de estas vesículas (fig. 9-19). La cinesina también se relaciona con el movimiento de vesículas derivadas del RE, endosomas, lisosomas y gránulos secretorios. En la mayor parte de las células, los microtúbulos se organizan con sus extremos positivos situados fuera del centro de la célula, de modo que la cinesina tiende a desplazar vesículas y organelos hacia afuera en dirección a la membrana plasmática de la célula.

Dineínas citoplásmicas

La primera proteína motora relacionada con microtúbulos se descubrió en 1963 como causante del movimiento de cilios y flagelos. A esta proteína se le denominó **dineína**. De inmediato se sospechó la existencia de formas citoplásmicas, pero transcurrieron más de 20 años antes de purificar y caracterizar una proteína semejante a dineína en el tejido cerebral de mamíferos. Pronto se identificaron proteínas relacionadas en gran variedad de células no nerviosas, e igual que la cinesina, en la actualidad se cree que la **dineína citoplásmica**, como se le denominó, es una proteína motora ubicada en células eucariotas.

La dineína citoplásmica es una proteína enorme (peso molecular mayor de un millón de daltons) compuesta de 9 a 10 cadenas de polipéptido. La molécula contiene dos grandes cabezas globulares que actúan como motores generadores de fuerza (fig. 9-20, *a*). Ensayos de motilidad *in vitro* indican que, en contraste con la cinesina, la dineína citoplásmica se mueve a lo largo del microtúbulo hacia el extremo menos del polímero. Las pruebas sugieren cuando menos dos papeles para la dineína citoplásmica:

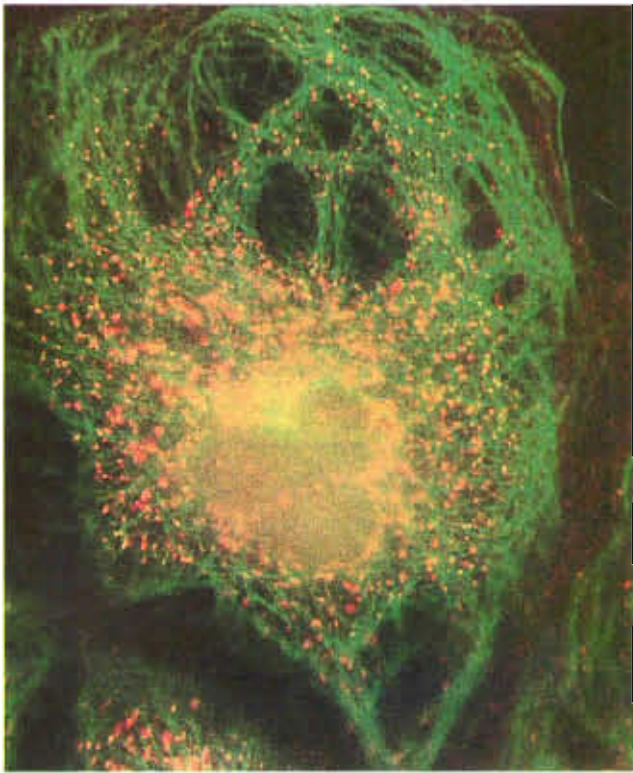


FIGURA 9-19. Demostración experimental de la localización conjunta de la cinesina con los microtúbulos. Esta célula cultivada fue doblemente marcada con anticuerpos contra cinesina (amarillo) y tubulina (verde). Los anticuerpos anticinesina tiñen las vesículas unidas a la membrana relacionadas con la red microtubular (observadas en color naranja donde los dos anticuerpos fluorescentes se superponen). (Según Scott T. Brady y K. Kevin Pfister, *J. Cell Science Suplemento* 14, 1991, con permiso de The Company of Biologists Ltd.)

1. Agente generador de fuerza para el movimiento de cromosomas durante la mitosis (capítulo 14).
2. Motor dirigido al extremo menos del microtúbulo para mover vesículas y organelos membranosos a través del citoplasma.

Se cree que en células nerviosas la dineína citoplásmica participa en el movimiento retrógrado de organelos citoplásmicos, o sea, desplazamiento hacia el cuerpo celular de la neurona. En las células fibroblásticas, la dineína citoplásmica quizás arrastre organelos, incluyendo vesículas de Golgi, lisosomas y endosomas, hacia el centro de la célula. Según este punto de vista, tal vez demasiado simplista, la cinesina y la dineína citoplásmica sirvan para mover materiales similares en direcciones opuestas sobre la misma red de vías (fig. 9-20, b).

Centros organizadores de microtúbulos

La función de un microtúbulo dentro de una célula viviente depende de su localización y orientación; por esto es impor-

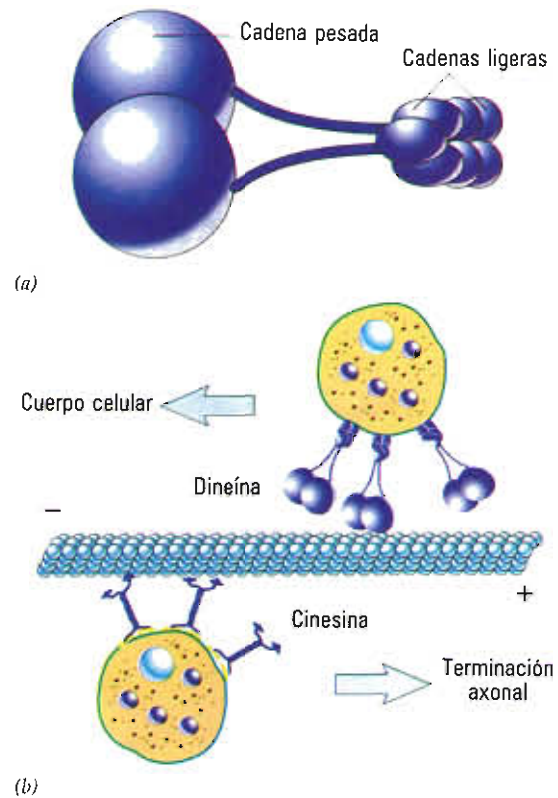


FIGURA 9-20. Dineína citoplásmica. a) Estructura de una molécula de dineína citoplásmica que consta de dos cabezas globulares grandes generadoras de fuerza, cada una compuesta de una cadena pesada de dineína, y un tallo, un número de subunidades más pequeñas en la base de la molécula, que se presume median la unión de la proteína motora a la carga que se transporta. b) Diagrama esquemático de dos vesículas moviéndose en dirección opuesta a lo largo del mismo microtúbulo, una impulsada por cinesina moviéndose en dirección anterógrada y la otra por dineína citoplásmica en dirección retrógrada. (b: Según R.B. Vallee y G.S. Bloom. Reproducido con permiso de *Annual Review of Neuroscience*, vol. 14, © 1991 por Annual Reviews, Inc.)

tante entender por qué un microtúbulo se forma en un sitio y no en otro. La formación de microtúbulos a partir de los dímeros $\alpha\beta$ -tubulina ocurre en dos fases distintas: una más lenta de *nucleación*, en la cual inicialmente se forma una pequeña porción de los microtúbulos, y una fase más rápida de *alargamiento*. La nucleación de los microtúbulos *in vivo* ocurre junto con otras estructuras especializadas que, debido a su papel en la formación de los microtúbulos, se denominan **centros organizadores de microtúbulos (COMT)**.

Centrosomas

En células animales, los microtúbulos del citoesqueleto de ordinario se forman junto con el **centrosoma**, estructura compleja que contiene dos **centríolos** en forma de barril rodeados por un **material pericentriolar** electrónicamente denso y amorfo (fig. 9-21, a, b). Los centriolos son estructuras cilíndricas de casi $0.2 \mu\text{m}$ de diámetro y generalmente

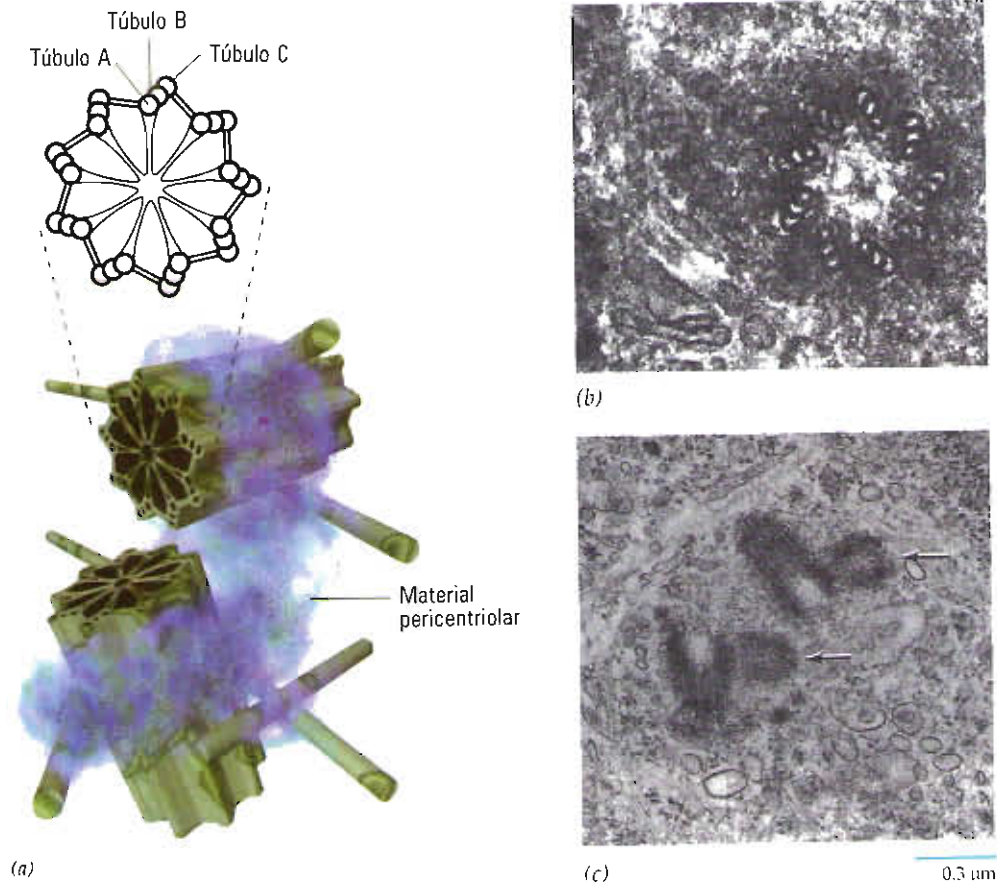


FIGURA 9-21. Estructura del centrosoma. *a)* Diagrama de un centrosoma que muestra los pares de centriolos, el material pericentriolar (MPC) que lo rodea, y los microtúbulos que surgen del MPC, donde ocurre la nucleación. *b)* Micrografía electrónica de una sección transversal de un centriolo mostrando la disposición en rayos de rueda de las nueve fibrillas periféricas, cada una de las cuales consta de un microtúbulo completo y dos microtúbulos incompletos. *c)* Micrografía electrónica que muestra dos pares de centriolos situados en una invaginación de la superficie del núcleo. Cada par consta de un largo centriolo progenitor y un centriolo hijo más pequeño (flecha), que sufre alargamiento en esta fase del ciclo celular (analizado en la sección 14-2). (*a*): Según S.J. Doxsey y cols., *Cell* 76:643, 1994; *b*): cortesía de B.R. Brinkley; *c*): según Jerome B. Rattner y Stephanie G. Phillips, *J. Cell Biol.* 57:363, 1973; con permiso de Rockefeller University Press.)

casi el doble de largo. Con muy pocas excepciones, los centriolos contienen nueve fibrillas regularmente espaciadas, que en sección transversal cada una aparece como una banda de tres microtúbulos designados túbulo A, B y C, conectados al centro del organelo mediante un rayo radial. Sólo el túbulo A está completo (fig. 9-21, *a, b*). Cada banda de tres microtúbulos se inclina en ángulo con la superficie de la estructura, dando a los centriolos un aspecto característico de rehilete. Los centriolos casi siempre se encuentran en pares, con los miembros de la pareja situados en ángulo recto entre sí (fig. 9-21, *a, c*). Típicamente, el centrosoma se sitúa cerca del centro de la célula, justo por fuera del núcleo. El examen cuidadoso de cortes efectuados a través de la región del centrosoma muestra que es un sitio donde convergen numerosos microtúbulos.

La mejor técnica para estudiar el origen de los microtúbulos del citoesqueleto es despolimerizar las células a temperatura fría o con "venenos" de microtúbulo, como noco-

dazol o colquicina,¹ y en seguida observar el ensamblado de los microtúbulos luego de suministrar calor a la célula o de eliminar el veneno. Se puede observar el desensamblado y reensamblado de los microtúbulos fijando las células en diferentes momentos y tiñendo los microtúbulos con anti-

¹ Aunque la colquicina es el veneno de microtúbulos mejor estudiado, todavía no se conoce por completo su mecanismo de acción. La colquicina actúa enlazándose a los dímeros de tubulina; pero no puede enlazarse a moléculas de tubulina dentro de un microtúbulo, excepto, al parecer, a la subunidad terminal. Se piensa que este fármaco despolimeriza los microtúbulos existentes porque se incorpora al extremo ensamblador del polímero (sea por unión directa a la subunidad terminal o por unión a una subunidad libre que luego se incorpora al extremo en crecimiento) impidiendo la adición de subunidades adicionales en ese sitio. Mientras tanto, el extremo opuesto del microtúbulo sufre despolimerización neta, lo que provoca la disolución del polímero.

cuerpos fluorescentes antitubulina. Pocos minutos después de suprimir las condiciones inhibitorias se observan uno o dos puntos fluorescentes brillantes en el citoplasma de cada célula. En 15 a 30 minutos (fig. 9-22, a) se observa un número creciente de filamentos marcados con fluorescencia que irradian fuera de estos focos. Cuando se efectúa un corte en estas mismas células y se examina en el microscopio electrónico, se observa que los microtúbulos recién formados irradian de un centrosoma. El examen atento muestra que los microtúbulos no penetran realmente al centrosoma ni hacen contacto con los centríolos, sino más bien surgen del material denso pericentriolar que reside en la periferia del centrosoma. Este material al parecer sirve para iniciar la formación de los microtúbulos. La polaridad de estos microtúbulos siempre es la misma; el extremo menos se relaciona con el centrosoma y el extremo más (donde ocurre el alargamiento, como se describe luego) se sitúa en el lado opuesto del polímero (fig. 9-22, b).

Corpúsculos basales y otros centros organizadores de microtúbulos

Los centrosomas no son los únicos COMT en las células. Por ejemplo, los microtúbulos que forman las fibras de un cilio o de un flagelo se originan de una estructura denominada **corpúsculo basal**, residente en la base del organelo en fase de prolongación (fig. 9-35). Los corpúsculos basales tienen estructura idéntica a la de un centríolo, y de hecho los corpúsculos basales y los centríolos pueden originarse entre sí. El flagelo de un espermatozoide, por ejemplo, se forma a partir de un corpúsculo basal derivado de un centríolo que fue parte del huso meiótico del espermatozito del cual se originó el espermatozoide.

Otros tipos de células tienen diferentes centros organizadores de microtúbulos. Por ejemplo, en hongos, el COMT primario se presenta como una estructura discoide denominada **corpúsculo polar del huso**, que está integrado a la envoltura nuclear (fig. 9-23). Los microtúbulos que crecen por fuera del corpúsculo polar del huso forman parte del citoesqueleto citoplásmico, en tanto que los microtúbulos que se dirigen hacia adentro forman parte del huso mitótico (formado dentro del núcleo de estos organismos). Las plantas carecen tanto de centrosomas como de centríolos. El COMT primario de una célula vegetal consta de placas de material situado en la superficie externa de la envoltura nuclear a partir de la cual surgen los microtúbulos del citoesqueleto (fig. 9-24).

Cualquiera que sea su aspecto, los COMT al parecer desempeñan un papel similar en las células; controlan el número de microtúbulos que forman la polaridad de dichos microtúbulos, el número de protofilamentos que constituyen sus paredes, y el sitio y momento en el cual se ensamblan los microtúbulos. Además, los COMT comparten un elemento proteínico común: un tipo de tubulina descubierta a mediados del decenio de 1980 denominado γ -tubulina. A diferencia de las tubulinas α y β , que representan casi 2.5% de la proteína de una célula no neural, la γ -tubulina sólo equivale a casi 0.005% de la proteína total de la célula. Se ha observado que los anticuerpos fluorescentes γ -tubulina tiñen cualquier tipo de COMT, incluyendo el material pericentriolar de los centrosomas (fig. 9-25, a), lo que sugiere que la γ -tubulina es un componente vital para el ensamblado de microtúbulos. Esta conclusión se apoya en otros estudios. Por ejemplo, la microinyección de anticuerpos anti γ -tubulina a una célula viviente impide el en-

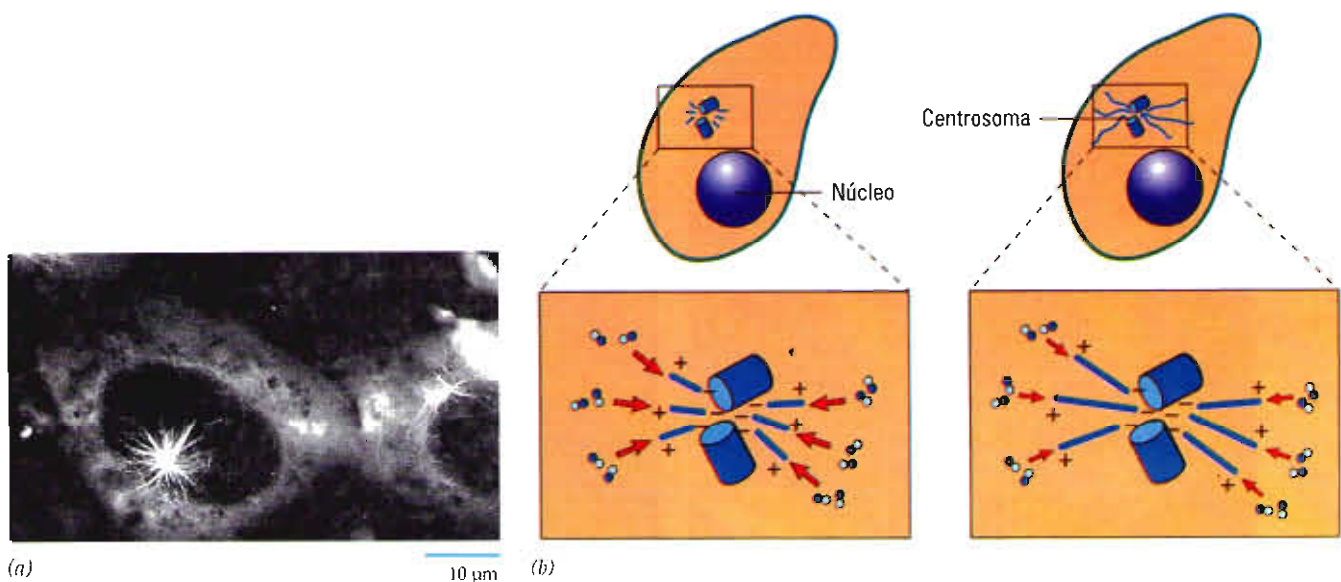


FIGURA 9-22. Demostración experimental de la nucleación del microtúbulo en el centrosoma. a) Micrografía de fluorescencia de un fibroblasto cultivado expuesto a colcemida para efectuar el desensamblado de los microtúbulos de la célula y luego se permitió su recuperación durante 30 minutos antes del tratamiento con anticuerpos fluorescentes y antitubulina. La estructura brillante como estrella marca el centrosoma, un centro organizador de microtúbulos (COMT) a partir del cual se ensamblaron nuevos microtúbulos ha empezado a desarrollarse en todas direcciones. b) Diagrama del crecimiento nuevo de microtúbulos mostrando la adición de subunidades en el extremo más del polímero, lejos del centrosoma. (a: Según Mary Osborn y Klaus Weber, Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 73:869, 1976.)

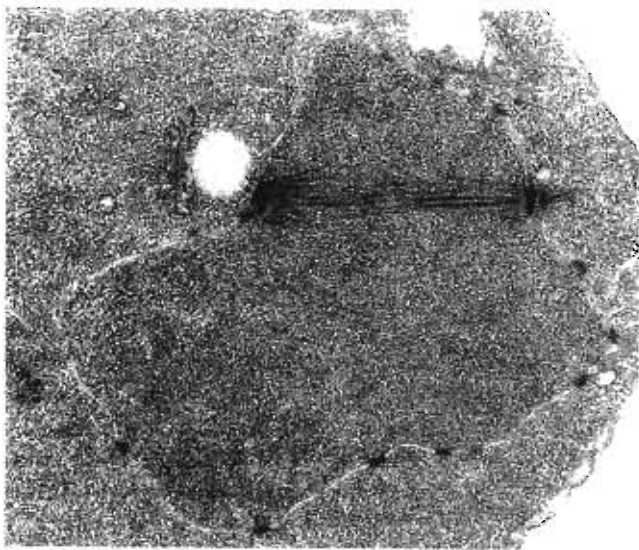


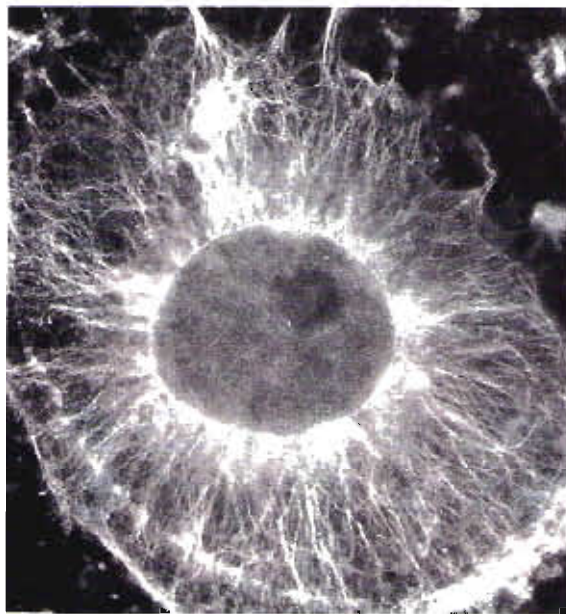
FIGURA 9-23. Centro organizador de microtúbulos de una célula de levadura. El centro primario de organización de microtúbulos de las células micóticas es un huso de forma discoide con un corpúsculo en un polo integrado en la envoltura nuclear. Los microtúbulos del huso mitótico se pueden observar emergiendo del corpúsculo situado en el polo del huso y penetrando al núcleo. Los microtúbulos citoesqueléticos son nucleados en la superficie externa del corpúsculo del polo del huso. (Cortesía de John Kilmartin.)

samblado de microtúbulos luego de la despolimerización por fármacos o temperaturas frías. De manera similar, las células de hongos genéticamente manipuladas para que no sintetizen γ -tubulina también son incapaces de ensamblar microtúbulos normales. Se asume que la γ -tubulina es un elemento clave en la nucleación de microtúbulos, tal vez porque forma una "plantilla" de forma anular sobre la cual se ensamblan los dímeros α/β -tubulina (como en la figura 9-25, b).

Propiedades dinámicas de los microtúbulos

Aunque los microtúbulos morfológicamente parecen muy similares, cualquiera que sea su localización dentro de la célula, hay diferencias notables en la estabilidad de estos polímeros. Los microtúbulos del huso mitótico o del citoesqueleto son sumamente *lábiles*, o sea, susceptibles de destrucción. Los microtúbulos de neuronas maduras son mucho menos lábiles, en tanto que los de cilios y flagelos son muy estables.

Las células vivientes pueden someterse a gran variedad de tratamientos que provocan desensamblado de los microtúbulos citoesqueléticos sin interferir con la mayor parte de las otras estructuras celulares. Estos tratamientos incluyen temperaturas frías; presión hidrostática; concentración elevada de Ca^{2+} , y empleo de varias sustancias químicas, incluyendo colquicina, vinblastina, vincristina, nocodazol y podofilotoxina. El fármaco taxol interrumpe las actividades dinámicas de los microtúbulos por un mecanis-



(a)



(b)

4 μm

FIGURA 9-24. Centro organizador de microtúbulos de una célula vegetal. a) Localización de los microtúbulos de una célula de la endosperma *Haemaphys* durante la interfase (entre las divisiones mitóticas). Se observan los microtúbulos que emanan de la superficie del núcleo. b) La misma célula observada en a) teñida con un anticuerpo dirigido contra centrosomas purificados de ternera. La superficie externa del núcleo de la célula vegetal aparece con un brillo fluorescente que indica la presencia de proteínas homólogas a las de los centrosomas de la célula animal. (Cortesía de Anne-Marie Lambert.)

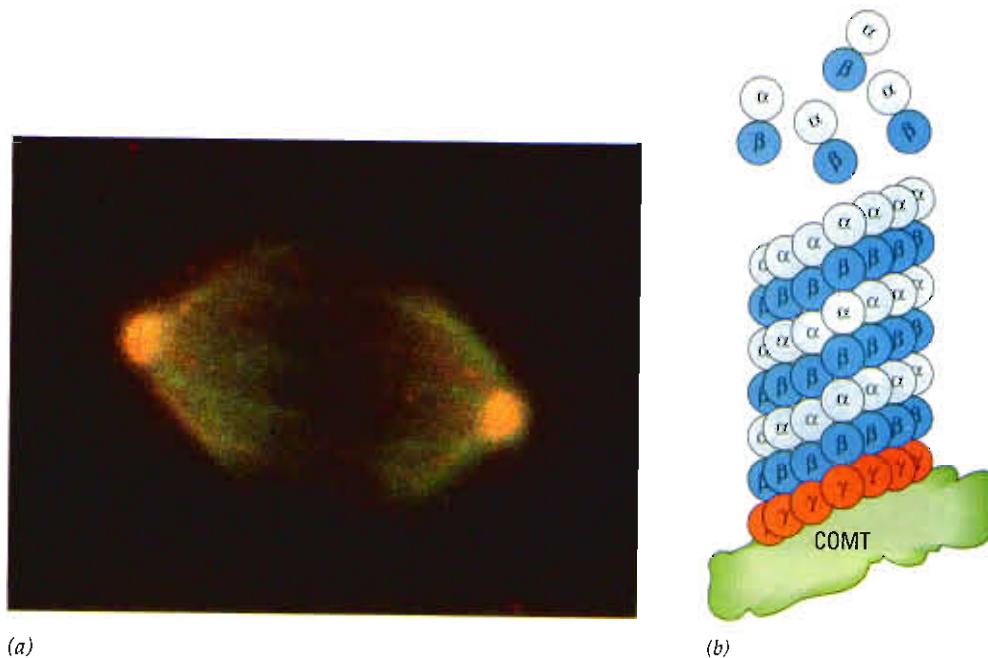


FIGURA 9-25. Papel de la γ -tubulina en la función del centrosoma. *a)* Fibroblasto en división con doble tinción con anticuerpos contra γ -tubulina (rojo) y β -tubulina (verde). El color naranja se debe a la coincidencia de dos tipos de tubulina que se presentan en los dos centrosomas localizados en polos opuestos de una célula en división. *b)* Modelo de la función de la γ -tubulina en el COMT sirve para nuclear el ensamblado de microtúbulos. La nucleación se inicia conforme las subunidades β -tubulina de los heterodímeros α/β se unen a la γ -tubulina enlazada al centro organizador de microtúbulos. Esto determina la orientación de los dímeros de tubulina en protofilamentos y por lo tanto define la polaridad del microtúbulo. (*a:* Cortesía de M. Katherine Jung y Berl R. Oakley; *b:* según B.R. Oakley, Trends Cell Biol. 2:1, 1992.)

no muy diferente; se enlaza al polímero del microtúbulo y evita su desensamblado.

La labilidad de los microtúbulos refleja que son polímeros originados por asociaciones *no covalentes* de los bloques diméricos de construcción. Los tratamientos mencionados antes destruyen los microtúbulos causando su despolimerización. Esta facilidad para despolimerizarse revela el potencial de los microtúbulos del citoesqueleto de una célula viviente para sufrir cambios dinámicos en su estado de organización estructural. Los microtúbulos del citoesqueleto en general están sujetos a despolimerización y repolimerización conforme cambian las necesidades de la célula de un momento a otro. Este ciclo de desensamblado y reensamblado puede observarse fácilmente en células cultivadas.

Durante la interfase (periodo del ciclo celular entre dos divisiones mitóticas), la mayor parte de las células del cultivo se encuentran firmemente fijas al fondo del plato de cultivo y poseen un citoesqueleto microtubular altamente organizado del tipo que se muestra en la figura 9-11. Conforme la célula se prepara para entrar en mitosis, una onda de desensamblado recorre sus microtúbulos citoesqueléticos, la célula retorna a su forma esférica y pierde su fijación al sustrato, con formación simultánea del huso mitótico. A continuación, luego de la mitosis, el desensamblado del aparato mitótico va seguido por el reensamblado de los microtúbulos citoesqueléticos y el aplanamiento de la célula contra la superficie del plato. Estos cambios espectaculares

en la organización espacial de los microtúbulos se logran sin destrucción o síntesis de subunidades de tubulina. Más bien, los microtúbulos que constituyen el citoesqueleto se forman con las mismas subunidades que pocos minutos antes eran parte del huso mitótico. Se podría hacer una analogía con la demolición de un viejo edificio de ladrillos, donde luego se utilizan los mismos ladrillos para construir un nuevo edificio, todo en cuestión de pocos minutos.

La rápida conversión de un tipo de estructura microtubular en otro ilustra la naturaleza dinámica de estos organelos, pero se puede lograr una perspectiva aún más clara mediante microinyección de tubulina marcada en una célula cultivada fuera de su etapa de división. Las subunidades marcadas se incorporan rápidamente a los microtúbulos preexistentes del citoesqueleto, incluso en ausencia de una redistribución de las estructuras (fig. 9-26). Cuando se observa al microscopio de fluorescencia durante cierto tiempo una célula que contiene microtúbulos fluorescentes, se puede observar directamente el carácter dinámico de estos polímeros (fig. 9-27). En todo momento algunos microtúbulos crecen en longitud, en tanto que otros se encogen. Si se continúa la observación de microtúbulos individuales, se notará que su longitud aumenta o disminuye al azar entre las fases de crecimiento y encogimiento. Puesto que el encogimiento es más rápido que el alargamiento, con el tiempo desaparecen la mayor parte de los microtúbulos de la célula y se reubican en nuevos microtúbulos que crecen por fuera del centrosoma. Este comportamiento de los microtúbulos,

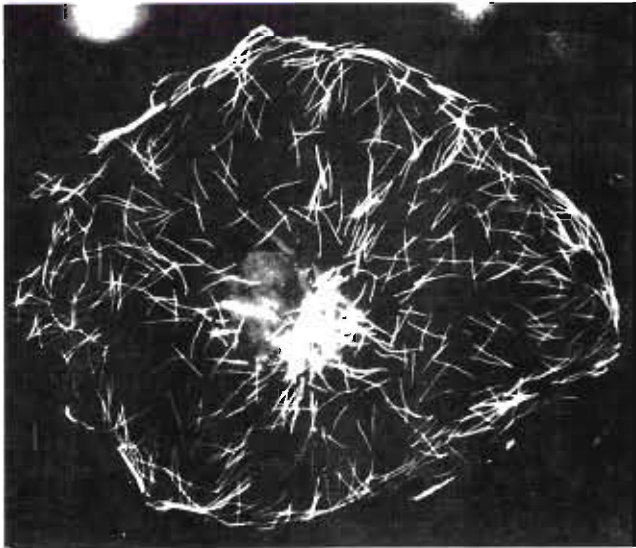


FIGURA 9-26. Dinámica del microtúbulo en las células vivientes. A este fibroblasto cultivado se le inyectó un pequeño volumen de tubulina unida mediante enlaces covalentes a biotina, una molécula pequeña cuya localización en la célula se puede determinar con facilidad empleando anticuerpos fluorescentes antibiotina. Cerca de un minuto después de la inyección, las células se fijaron y se determinó la localización de la tubulina biotinilada incorporada en los microtúbulos insolubles. De esta micrografía fluorescente es evidente que incluso durante periodos tan breves como un minuto, las subunidades de tubulina se incorporan ampliamente a los extremos en crecimiento de los microtúbulos citoesqueléticos. (Según Marc Kirschner, J. Cell Biol. 102, cover # 3, 1986, con permiso de Rockefeller University Press.)

de alternar hacia adelante y atrás entre las fases de crecimiento y acortamiento, se describe como *inestabilidad dinámica*. La inestabilidad dinámica conduce a un rápido intercambio entre subunidades de tubulina y polímeros. El continuo desensamblado y reensamblado de los microtúbulos permite a las células responder con prontitud a cualquier situación o participar en toda actividad que requiera remodelar la estructura del citoesqueleto.

Las subunidades se incorporan a un microtúbulo por adición en los extremos del polímero. Cuando se observan polímeros *in vitro*, se nota que crecen o se encogen por cambios en cualquiera de sus extremos, aunque tanto el ensamblado como el desensamblado pueden ocurrir con mayor rapidez en el extremo más. Sin embargo, la observación de células vivientes sugiere que el crecimiento y encogimiento *in vivo* ocurren de manera predominante en el extremo más del polímero, el extremo opuesto al centrosoma (u otro centro organizador de microtúbulos). El conocimiento de los factores que pueden influir en las tasas de crecimiento y acortamiento del microtúbulo proviene principalmente de estudios de polimerización y despolimerización de microtúbulos *in vitro*.

Factores que influyen en el ensamblado y desensamblado

La primera técnica con éxito para ensamblar microtúbulos *in vitro* fue desarrollada en 1972 por Richard Weisenberg,

de la Temple University. Asumiendo que un homogeneizado de células debe poseer todas las macromoléculas requeridas para el proceso de ensamblado, Weisenberg logró polimerizar tubulina en homogeneizados de cerebro a 37°C añadiendo Mg^{2+} , GTP y EDTA (que se enlazan a Ca^{2+} , un inhibidor de la polimerización). Weisenberg observó que los microtúbulos podían desensamblarse y reensamblarse una y otra vez con sólo descender y elevar la temperatura de la mezcla de incubación. La figura 9-28 muestra tres microtúbulos ensamblados en un tubo de ensaye a partir de tubulina purificada. Se puede notar que uno de los tres microtúbulos sólo contiene 11 protofilamentos (según indica su fino diámetro). No es raro que los microtúbulos ensamblados *in vitro* posean un número anormal de protofilamentos. Se puede incrementar mucho el ensamblado de microtúbulos *in vitro* añadiendo pedazos de microtúbulos o estructuras que contengan microtúbulos (fig. 9-29) que actúan como *semillas* para la adición de subunidades libres.

Los primeros estudios *in vitro* establecieron que se requiere GTP para el ensamblado de microtúbulos. El ensamblado de los dímeros de tubulina requiere la unión de una molécula de GTP a la subunidad β -tubulina.² No se necesita la hidrólisis de GTP para la verdadera incorporación del dímero al extremo de un microtúbulo. Más bien, el GTP se hidroliza a GDP poco después que el dímero se incorpora al microtúbulo y entonces el GDP permanece enlazado al polímero ensamblado (fig. 9-30, a). Cuando un dímero de un microtúbulo se libera durante el desensamblado y entra a la reserva soluble, el GDP intercambiable es sustituido por un nuevo GTP. Este intercambio de nucleótidos “recarga” el dímero y le permite servir una y otra vez como bloque de construcción para un microtúbulo.

El ensamblado de un microtúbulo requiere la hidrólisis de GTP, y por lo tanto no es una actividad celular sin costo. ¿Por qué evolucionó una vía de polimerización tan costosa? La respuesta más probable es que permite a una célula controlar la velocidad de reacciones opuestas, ensamblado y desensamblado, de manera independiente. Un dímero que se va añadiendo a un microtúbulo se encuentra enlazado a GTP, en tanto que el dímero que se libera del microtúbulo se halla unido a GDP. Estos dos tipos de subunidades poseen conformación diferente y por lo tanto distinta afinidad para otras subunidades del microtúbulo. Los dímeros de tubulina y GTP muestran mayor afinidad entre sí que los dímeros de tubulina y GDP. Como resultado, sería de esperar que la presencia de tubulina y GTP en el extremo de un protofilamento favoreciera la fijación de otra tubulina y GTP, en tanto que la presencia de un dímero de tubulina y GDP en esa posición favorecería su liberación del microtúbulo. Recordemos que la hidrólisis del GTP se retrasa un poco respecto de la incorporación de la subunidad. Por lo tanto, durante momentos de rápido crecimiento del microtúbulo, los dímeros de tubulina se añaden con mayor rapidez que

² También se une una molécula de GTP a la subunidad α -tubulina, pero no es intercambiable ni se hidroliza después de la incorporación de la subunidad, y no la consideraremos más.

FIGURA 9-27. Inestabilidad dinámica. a-c) Estas fotografías y los diagramas que las acompañan ilustran los cambios de longitud de los microtúbulos individuales dentro de las células vivientes. Las células fueron inyectadas con tubulina marcada con rodamina y se siguió la fluorescencia con videomicroscopía. Se produjo una marca de referencia a través de los microtúbulos mediante fotoblanqueamiento. Durante el periodo de observación (indicado en la parte superior derecha de los dibujos), el extremo del microtúbulo 1 se encoge y luego crece con respecto de su dominio blanqueado, el microtúbulo 2 creció, y el microtúbulo 3 creció y luego se encogió. Los cambios de longitud se deben a la ganancia y pérdida de subunidades distales al dominio blanqueado sobre cada microtúbulo. Estas fotografías ilustran la inestabilidad dinámica de los microtúbulos. Barra, 3 μm . (Según Paul J. Sammak y Gary G. Borisy. Reimpreso con permiso de Nature 332:725, 1988; copyright 1988, Macmillan Magazines Ltd.)

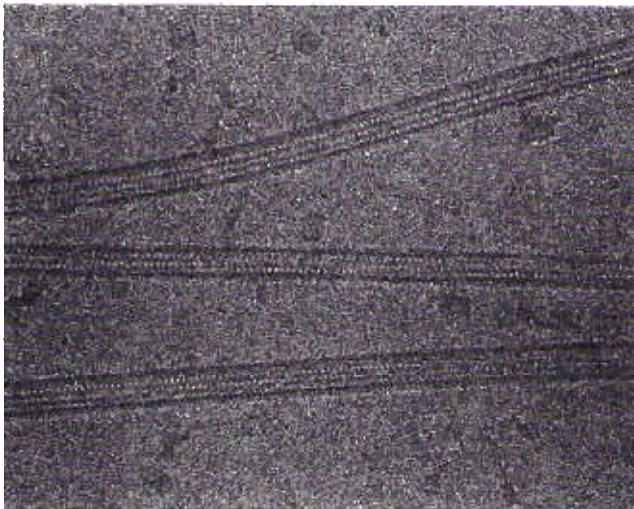
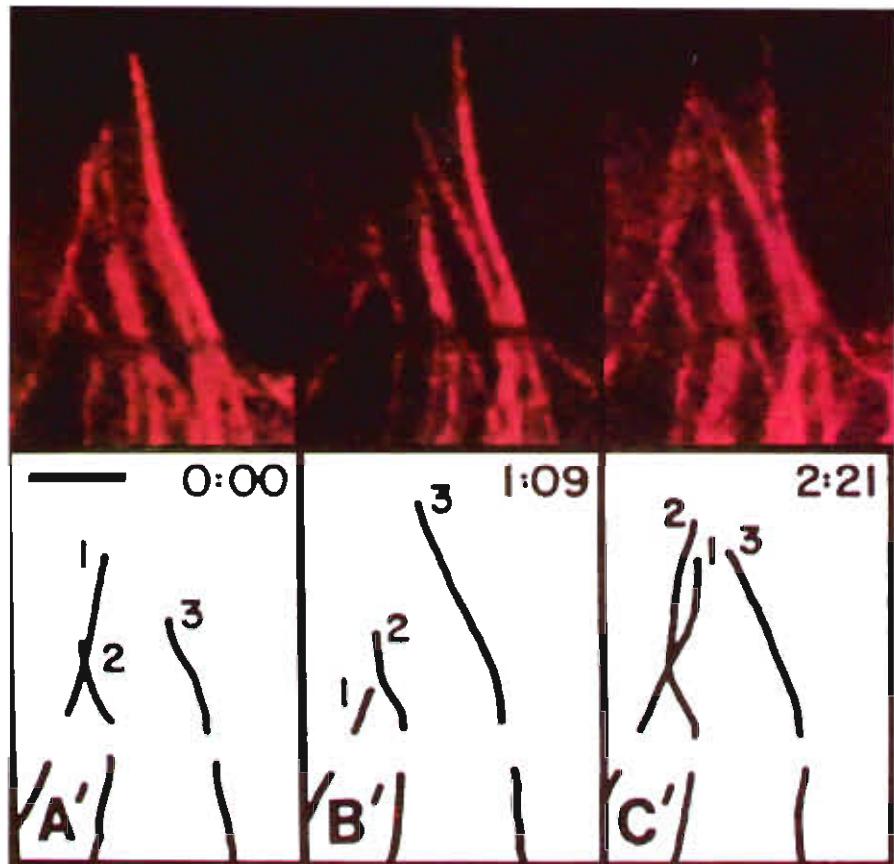


FIGURA 9-28. Microtúbulos ensamblados en el tubo de ensaye. Micrografía electrónica de microtúbulos congelados no fijados polimerizados *in vitro*. Se observan subunidades individuales de tubulina globular, y los protofilamentos verticales dentro de los cuales se organizan las subunidades. Nótese que la porción media de los tres microtúbulos sólo contienen 11 protofilamentos. (Cortesía de R.H. Wade, Institute de Biologie Structurale, Grenoble, Francia.)

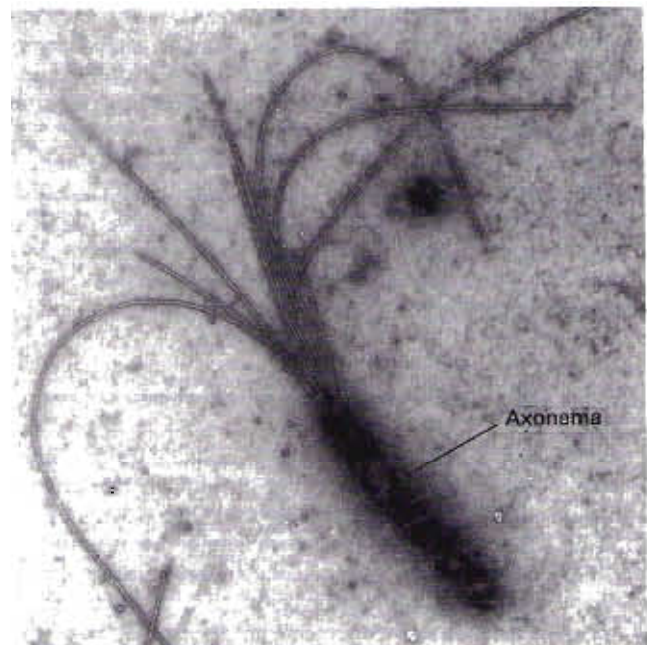


FIGURA 9-29. Ensamblado de la tubulina sobre estructuras microtubulares existentes. Micrografía electrónica mostrando el ensamblado *in vitro* de tubulina cerebral sobre los extremos de los microtúbulos de un axonema del flagelo de *Chlamydomonas*. (Cortesía de L.I. Binder y Joel L. Rosenbaum.)

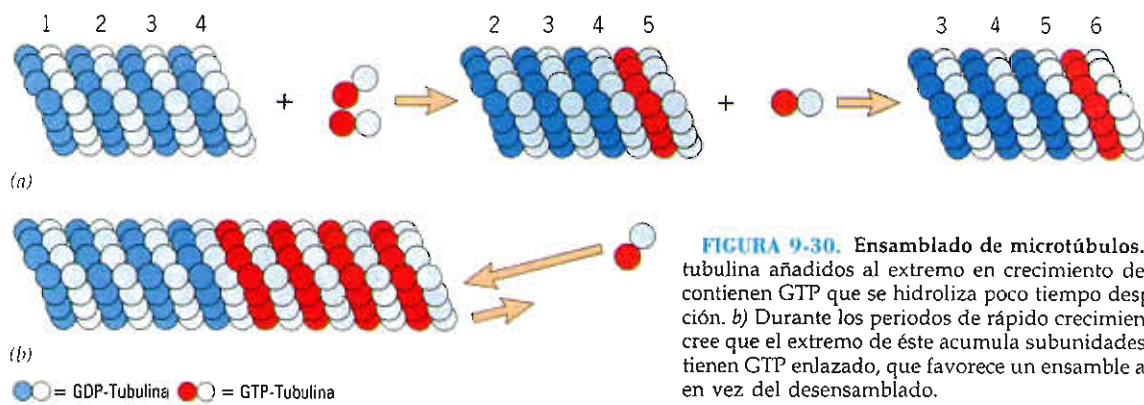


FIGURA 9-30. Ensamblado de microtúbulos. a) Heterodímeros de tubulina añadidos al extremo en crecimiento de un microtúbulo que contienen GTP que se hidroliza poco tiempo después de su incorporación. b) Durante los periodos de rápido crecimiento del microtúbulo se cree que el extremo de éste acumula subunidades de tubulina que contienen GTP enlazado, que favorece un ensamble adicional del polímero en vez del desensamblado.

la hidrólisis de su GTP. La presencia de una cubierta de dímeros de tubulina y GTP de alta afinidad en los extremos de los protofilamentos debe favorecer la adición de más subunidades y el crecimiento del microtúbulo (fig. 9-30, b). En contraste, cuando la velocidad de hidrólisis de GTP conserva el paso con la tasa de la adición de subunidades, se favorece el encogimiento del polímero en vez de su crecimiento. El acortamiento de los microtúbulos puede ocurrir con notable rapidez, lo que permite a una célula desensamblar su citoesqueleto microtubular a gran velocidad y anticiparse a un cambio en la actividad biológica.

En la página 331 se mencionó que ciertas proteínas relacionadas con microtúbulos (PRM) incrementan la estabilidad del polímero. Las PRM pueden actuar ayudando en la etapa de nucleación o bloqueando la liberación de subunidades de los extremos del polímero. Los cambios de concentración de las PRM o de su estado de fosforilación quizá tengan mayor impacto sobre el equilibrio entre ensamblado y desensamblado de los microtúbulos. Se cree que los diferentes tipos de microtúbulos en una célula (p. ej., microtúbulos del huso en comparación con los del citoesqueleto o los microtúbulos ciliares) que contienen diferentes PRM, pueden ayudar a la célula a ensamblar un tipo en tanto desensamblan otro tipo diferente. Los microtúbulos más estables se presentan en cilios y flagelos, lo cual es el tema de la siguiente sección.

Cilios y flagelos: estructura y función

Quienquiera que observe una gota de agua de un estanque con un microscopio e intente evitar que un protozoo se aleje nadando del campo del microscopio, apreciará la actividad de cilios y flagelos. **Cilios y flagelos** son organelos movibles en forma de pelos proyectados desde la superficie de gran variedad de células eucariotas. También las bacterias poseen estructuras conocidas como *flagelos*, pero los flagelos de los procariotes son simples filamentos sin relación evolutiva con su contraparte de los eucariotes. El siguiente análisis sólo se refiere a organelos de eucariotes.

Cilios y flagelos son dos versiones de la misma estructura que pueden distinguirse mejor por su patrón de movi-

miento. Un cilio por lo general puede compararse con un remo cuando la célula se mueve en dirección perpendicular al propio cilio. Durante su latido de potencia, el cilio se mantiene en estado rígido (fig. 9-31, a) conforme empuja contra el medio que lo rodea. En su latido de recuperación, el cilio se torna flexible y ofrece poca resistencia al medio. Los cilios tienden a presentarse en gran número sobre la superficie de una célula y de ordinario su actividad está coordinada (fig. 9-31, b). En organismos multicelulares, los cilios se utilizan para desplazar líquido y partículas materiales a través de diferentes conductos (fig. 9-31, c). Por ejemplo, en el hombre, el epitelio ciliado que reviste el conducto respiratorio impulsa hacia afuera de los pulmones el moco y los desperdicios atrapados.

En condiciones típicas, los flagelos son más largos que los cilios y se presentan en menor número sobre la superficie de una célula (fig. 9-32, a). A diferencia de los cilios, el latido de un flagelo es ondulatorio (fig. 9-32, b), con varias ondas presentes en cada momento a lo largo del flagelo (fig. 9-36). El latido de un flagelo genera una fuerza que impulsa hacia adelante o arrastra una célula en dirección paralela al eje longitudinal del flagelo. En organismos multicelulares, los flagelos se presentan principalmente en la cola del espermatozoide, donde su movimiento impulsa a la célula reproductiva hacia la superficie del óvulo.

Estructura de cilios y flagelos

Una micrografía electrónica de la sección transversal de un cilio o de un flagelo es una de las imágenes más familiares en biología celular (fig. 9-33, a). Toda la extensión del cilio o del flagelo está cubierta por una membrana que se continúa con la membrana plasmática de la célula. El centro del cilio, denominado **axonema**, contiene disposición de microtúbulos que corren longitudinalmente a través de todo el organelo. En casi todos los casos, el axonema consta de nueve microtúbulos periféricos dobles. Todos los microtúbulos del axonema tienen la misma polaridad: su extremo más se encuentra en la punta de la prolongación y su extremo menos en la base. Cada doblete periférico consta de un microtúbulo completo, *túbulo A*, y un microtúbulo incompleto, *túbulo B*, que contienen 10 a 11 subunidades en vez de las 13 habituales.

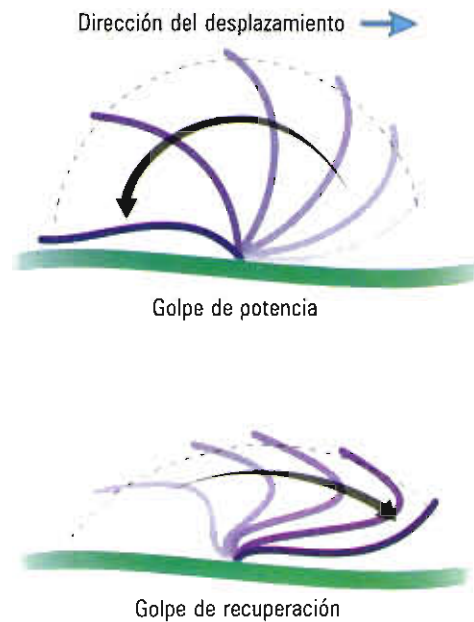
La estructura básica del axonema fue descrita por primera vez en 1954 por Don Fawcett y Keith Porter, de la Universidad de Harvard. Conforme mejoró la resolución del microscopio electrónico algunos elementos menos evidentes se hicieron visibles (fig. 9-33, b). Se observaron túbulos centrales incluidos dentro de prolongaciones que forman la *vaina central*, conectada a los túbulos A de los dobletes periféricos mediante un conjunto de *rayos radiales*. Los dobletes se conectan entre sí por un *punte interdoublete* compuesto de una proteína elástica, la nexina. De particular importancia fue la observación de que un par de "brazos", un *brazo interno* y un *brazo externo*, se proyectan desde el túbulo A en dirección de anterógrada (cuando se observa el cilio desde la base hacia la punta). Un corte longitudinal, o sea una sección a través del axonema paralela a su eje longitudinal, revela la naturaleza continua de los microtúbulos y la naturaleza discontinua de los otros elementos (fig. 9-34, a). Los rayos radiales, por ejemplo, ocurren típicamente en grupos de tres repetidos cuando mucho a 96 nm (fig. 9-34, b).

La misma disposición de 9 + 2 se observa en cilios y flagelos de prácticamente todos los organismos eucariotas, desde hongos hasta seres humanos, otra de las muchas observaciones que nos recuerdan la unidad de la vida. Aunque el patrón 9 + 2 se conserva insistentemente, hay varias desviaciones evolutivas notables de este modelo estructural. Por ejemplo, en los platelmintos se observa un patrón de 9 + 1, y en el cangrejo herradura asiático, la anguila y los insectos del género *Plectophora* un patrón 9 + 0. Algunos flagelos que carecen de elementos centrales son móviles y otros no lo son.

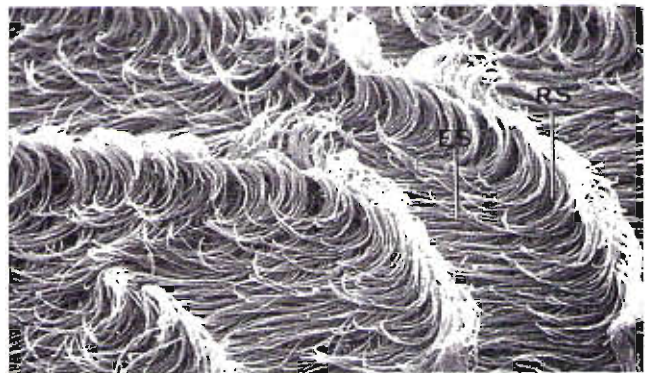
Como se mencionó en la página 339, un cilio o un flagelo surgen de un *corpúsculo basal* (fig. 9-35) cuya estructura es comparable al centríolo de la figura 9-21. Igual que un cilio o un flagelo, un corpúsculo basal contiene nueve fibras periféricas, pero cada una consta de tres microtúbulos en vez de dos. El túbulo A está completo, en tanto que los túbulos B y C ambos son incompletos. No hay microtúbulos centrales en el corpúsculo basal ni en el centríolo. Los túbulos A y B del corpúsculo basal se alargan para formar los dobletes del cilio o del flagelo (fig. 9-35). Cuando se secciona un cilio o flagelo de la superficie de una célula viviente, se regenera un nuevo organelo como excrescencia del corpúsculo basal.

Brazos de dineína

El mecanismo para la locomoción de cilios y flagelos reside por completo en el axonema, según se manifiesta en experimentos donde se cortan cilios de su conexión con la célula y



(a)



(b)

10 μm



(c)

3.5 μm

FIGURA 9.31. Latido ciliar. a) Diferentes etapas en el latido de un cilio. b) Los cilios sobre la superficie de un protozoario ciliado laten siguiendo ondas metacronales en las cuales los cilios de una hilera dada se encuentran en la misma etapa del ciclo, pero los de hileras adyacentes se encuentran en etapas diferentes. RS, cilio en recuperación luego del latido; ES, cilio en latido de potencia eficiente. c) Cilios sobre la superficie del labio (fimbria) del oviducto del ratón. (b: Reimpreso con permiso de G.A. Horridge y S.L. Tamm, Science 163:818, 1969, copyright 1969 American Association for the Advancement of Science; c: cortesía de Ellen R. Dirksen.)



(a)

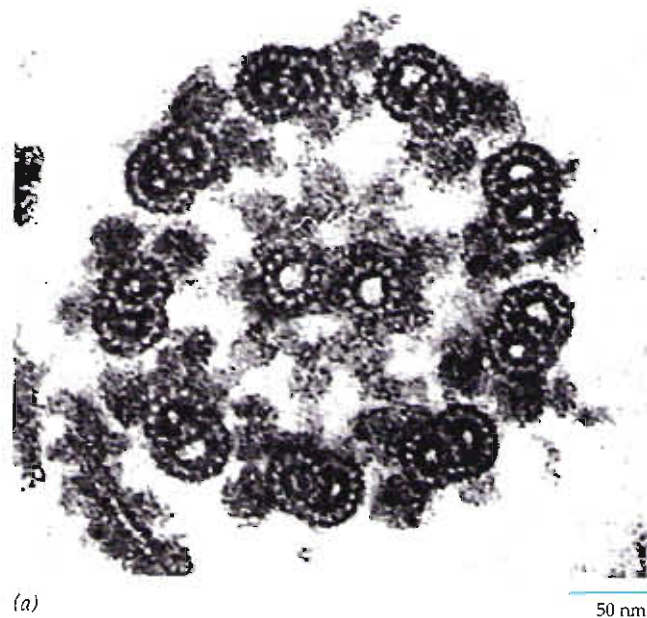


(b)

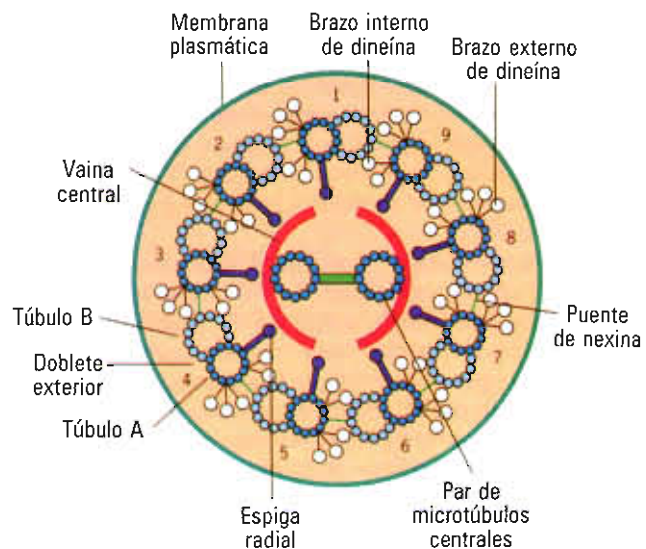
FIGURA 9-32. Flagelo eucariote. a) Alga biflagelada unicelular, *Chlamydomonas reinhardtii*. Los dos flagelos aparecen de color verde debido al anticuerpo fluorescente dirigido contra una de las principales proteínas de membrana flagelar. El color naranja resulta de la autofluorescencia de la clorofila de la célula. b) Etapas en el latido de un flagelo. (a: Cortesía de Robert A. Bloodgood.)

se disuelve su membrana superficial. El axonema restante todavía puede generar latidos rítmicos cuando se añaden Mg^{2+} y ATP (fig. 9-36). Cuanto mayor sea la concentración de ATP, mayor será la frecuencia del batir de estos organelos "reactivados". La proteína encargada de convertir la energía química del ATP en energía mecánica para la locomoción ciliar fue aislada en el decenio de 1960 por Ian Gibbons, de la Universidad de Harvard. Estos experimentos suministran un elegante ejemplo de la relación entre estructura y función en sistemas biológicos y los métodos para mostrar esta relación mediante análisis experimental.

Empleando soluciones capaces de solubilizar diferentes componentes, Gibbons pudo efectuar una disección química de los cilios del protozoo *Tetrahymena* (fig. 9-37). En el paso 1 se muestra un axonema intacto. La disección de la membrana que envuelve el axonema se efectuó disolviendo la membrana con el detergente digitonina (paso 2). Los axonemas aislados se disecaron posteriormente sumergiéndolos en solución con EDTA, un compuesto que se enlaza a iones divalentes (*quelatos*) y los elimina. Cuando se examinaron en el microscopio electrónico los axonemas tratados con EDTA, los túbulos centrales habían desaparecido, igual que los brazos que se proyectaron desde los túbulos A (paso 3). Simultáneamente con la pérdida de estas estructuras, los axonemas pierden su capacidad para hidrolizar ATP, en tanto que el sobrenadante adquiere esa capacidad. La ATPasa extraída de los axonemas fue una proteí-



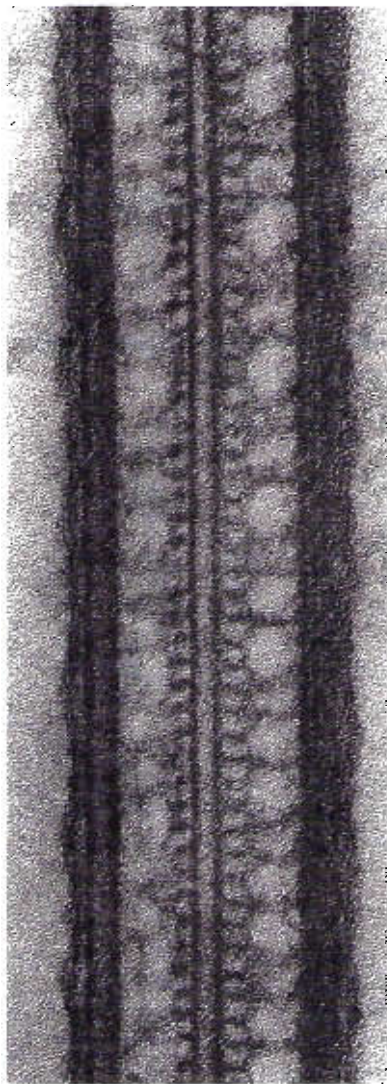
(a)



(b)

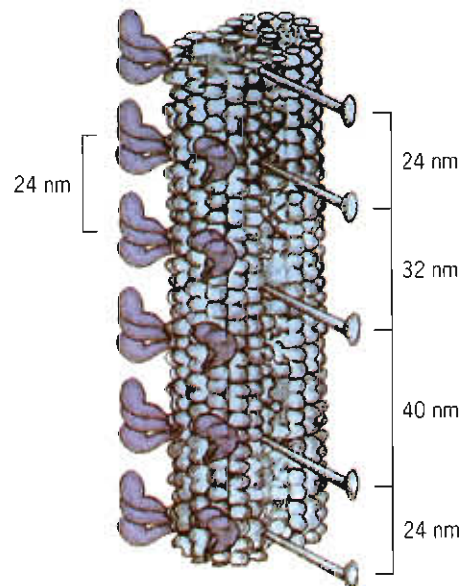
FIGURA 9-33. Estructura de un axonema ciliar o flagelar. a) Sección transversal a través del axonema de un espermatozoide fijado en una solución que contiene ácido tánico, que suministra un contraste negativo permitiendo la resolución de subunidades del microtúbulo. Se observan los dobles periféricos que consisten en un microtúbulo completo y uno incompleto, en tanto que los dos microtúbulos centrales están completos. Los brazos de dineína se observan como prolongaciones "vellosas" desde la pared del microtúbulo completo. b) Diagrama de un axonema que muestra la estructura de las fibras microtubulares, los dos tipos de brazos de dineína (brazos externos de tres cabezas y brazos internos de dos cabezas), los enlaces de nexina entre los dobles, la vaina central que rodea los microtúbulos centrales y los rayos radiales que se proyectan desde los dobles externos hacia la vaina central. (a: Cortesía de Lewis G. Tilney y K. Fujiwara.)

na enorme (más de dos millones de daltons) a la cual se dio el nombre de *dineína*, y en la actualidad se conoce como *dineína ciliar* para distinguirla de la dineína citoplásmica,



(a)

FIGURA 9-34. Vista longitudinal de un axonema. *a)* Micrografía electrónica de una sección longitudinal media de una región recta de un cilio. Los rayos radiales se observan uniendo la vaina central con el microtúbulo A del doblete situado a la derecha. Estos rayos se sitúan en grupos de tres. *b)* Diagrama de una sección longitudinal del doblete flagelar. Los radios emergen en grupos de tres, que se repiten (a 96 nm en este caso) a lo largo del trayecto del microtúbulo. Los brazos externos de dineína están espaciados a intervalos de 24 nm. (*a:* Según Fred D. Warner y Peter Satir, *J. Cell Biol.* 63:41, 1974; con permiso de Rockefeller University Press.)



(b)

proteína relacionada que participa en el transporte de organelos (pág. 336). Cuando se mezclaron las partes insolubles del axonema con la proteína insoluble en presencia de Mg^{2+} , gran parte de la actividad ATPasa se relacionó, una vez más, con el material insoluble de la mezcla (paso 4). El examen de los axonemas después de mezclarse con dineína y Mg^{2+} demostró que los brazos habían reaparecido sobre los túbulos A. Gibbons concluyó que los brazos observados en una sección transversal de los cilios contienen ATPasa que participa en la utilización de la energía y, presumiblemente, es requerida para la locomoción.

En investigaciones subsiguientes se observó que el tratamiento de axonemas aislados del espermatozoide con solución salina concentrada (0.6 M NaCl) elimina selectivamente los brazos externos y deja los brazos internos en su sitio (paso 5). Cuando se añadió ATP a los axonemas que carecen de brazos externos, latieron a una velocidad equivalente a casi la mitad del axonema intacto, aunque muestran ondas de forma normal. Este dato sugiere que cada

hilera de brazos genera casi la mitad de la fuerza empleada para el movimiento.

El examen con microscopio electrónico de los brazos externos liberados por la solución salina concentrada mostró que contienen tres cabezas globulares unidas por delgados tallos a una base común (fig. 9-38, *a*). Cada cabeza es un puente transversal del tipo ilustrado en la figura 9-38, *b*, que hidroliza ATP. En el axonema intacto, la base de la proteína está firmemente unida a la superficie exterior del túbulo A con las cabezas globulares proyectadas hacia el túbulo B del doblete vecino (fig. 9-39). Los brazos internos, extraídos posteriormente empleando procedimientos más burdos, pertenecen a tipos distintos, algunos con tres cabezas globulares que recuerdan los brazos externos y otros sólo contienen dos cabezas.

Mecanismo de locomoción de cilios y flagelos

Según se analizará posteriormente en este capítulo, el acortamiento del tejido muscular se debe al deslizamiento de

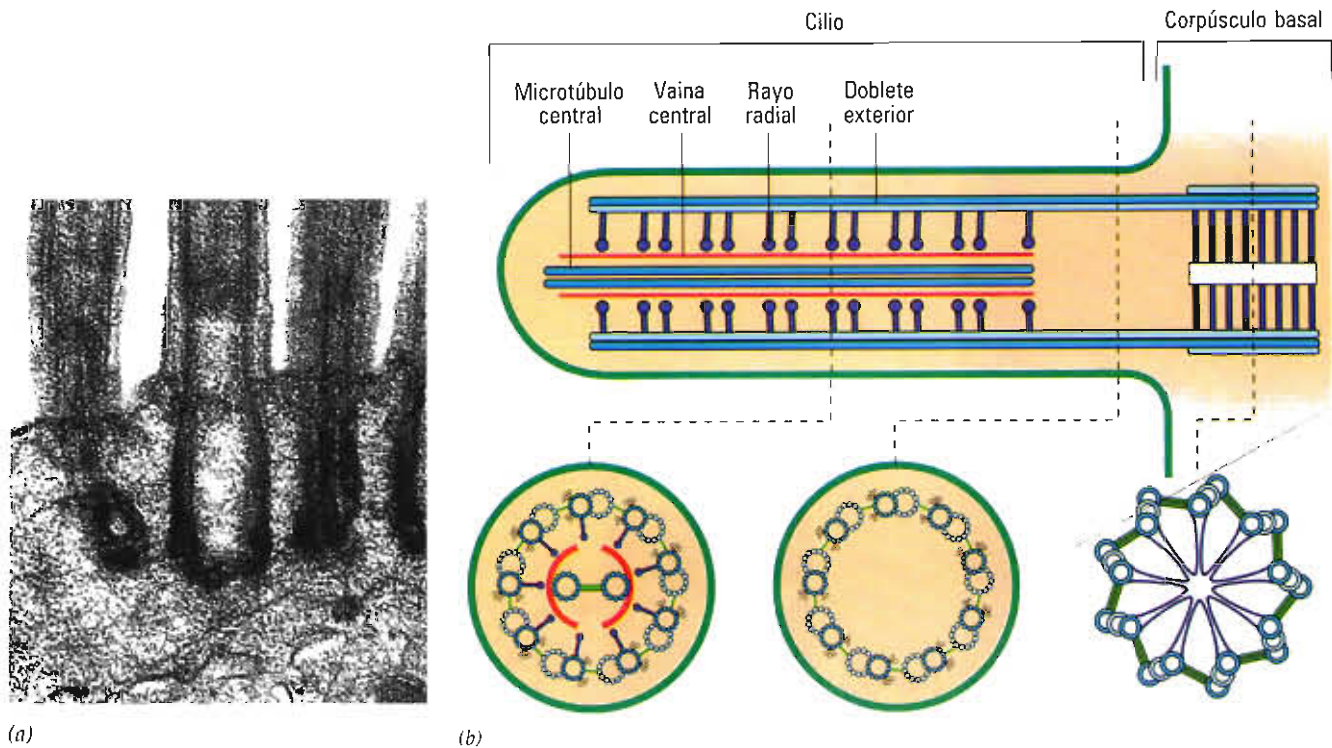


FIGURA 9-35. Corpúsculo basal y axonemas ciliar y flagelar. *a)* Micrografía electrónica de una sección longitudinal a través de los corpúsculos basales de varios cilios en la superficie apical de células epiteliales del oviducto de conejo. *b)* Diagrama de la relación estructural entre los microtúbulos del corpúsculo basal y el axonema de un cilio o de un flagelo. (*a:* Cortesía de R.G.W. Anderson.)

filamentos de actina a lo largo de filamentos adyacentes de miosina mediante fuerzas generadas por un puente transversal parecido a una cremallera residente en la cabeza de la molécula de miosina. Tomando como modelo el sistema de actinmiosina, se propuso que el movimiento ciliar podía explicarse por el deslizamiento relativo de dobletes microtubulares adyacentes. En este modelo (mostrado en la figura 9-39), los brazos de dineína actúan como puentes transversales que al retorcerse generan la fuerza requerida para el movimiento de cilios o flagelos. El brazo de dineína del túbulo A de un doblete se fija al túbulo B del doblete vecino (paso 1, fig. 9-39) y a continuación sufre un cambio de conformación que provoca que el túbulo A se deslice una distancia perceptible hacia la base del túbulo B al que está fijo (paso 2). El brazo de dineína se desprende entonces del túbulo B (paso 3) y vuelve a fijarse a otro sitio para empezar un nuevo ciclo (paso 4). El deslizamiento sobre un lado del axonema alternaría con el deslizamiento en el otro lado, de modo que una parte del cilio o del flagelo siempre se inclina en una dirección y luego en la dirección opuesta (fig. 9-40).

Los datos de investigación acumulados continúan apoyando la teoría del deslizamiento de los microtúbulos y el papel de los brazos de dineína. Charles Brokaw, del California Institute of Technology, logró observar directamente el deslizamiento de los microtúbulos en axonemas flagelares en acción. En estos estudios se desnudaron axonemas aislados de su membrana y se incubaron con diminutas esferitas doradas que se fijan a la superficie externa expuesta de los

dobletes periféricos. Las esferitas actuaron como marcadores fijos sobre sitios específicos de los dobletes (fig. 9-41). A continuación se observó la posición relativa de las esferitas en tanto se estimuló la actividad de los axonemas añadiendo ATP. Conforme el axonema se desplazaba hacia atrás y adelante, la distancia entre las esferitas de diferentes dobletes aumentó y disminuyó de manera cíclica, como sería de esperar si dobletes vecinos se deslizaran hacia arriba y hacia abajo uno sobre otro.

Para que el deslizamiento de los microtúbulos incline el cilio o el flagelo, alguna parte del axonema debe ofrecer resistencia al deslizamiento. De otro modo, las fibras simplemente se deslizarían hacia adelante sin causar inclinación. Los rayos radiales, los enlaces entre dobletes, o ambos, probablemente suministran la resistencia. Experimentos *in vitro* apoyan la existencia de una estructura que resiste el deslizamiento en el axonema. Cuando se incuban con ATP axonemas aislados, ocurren movimientos normales. Si se trata primero a estos axonemas con la enzima proteolítica tripsina en condiciones leves, sólo suficientes para destruir la integridad de los rayos radiales y de las fibras entre los dobletes, el axonema se desintegra al añadir ATP. Utilizando un microscopio de luz equipado con iluminación en campo oscuro se puede observar el movimiento de los dobletes separándose entre sí (fig. 9-42). Cuando los rayos o los interdobletes no oponen resistencia ya no se observa la actividad deslizante y los dobletes simplemente pasan uno sobre otro hasta separarse por completo.



FIGURA 9-36. Espermatozoide del erizo de mar reactivado con 0.2 mM de ATP luego de la desmembración con el detergente Triton X-100. Esta microfotografía de múltiples exposiciones se obtuvo con cinco destellos (flash) de luz y muestra el flagelo reactivado en diferentes etapas de su latido. (Según Charles J. Brokaw y T.F. Simonick, J. Cell Biol. 75:650, 1977, con permiso de Rockefeller University Press.)

Regulación de la locomoción ciliar y flagelar

Considerando que los cilios laten 10 a 40 veces por segundo, que cada latido tiene una orientación precisa y que este movimiento de ordinario es coordinado de modo que miles de cilios actúan en conjunto para producir el movimiento deseado, es claro que este tipo de actividad locomotora debe estar estrechamente regulada. Es digno de mencionar que cilios y flagelos aislados mantienen prácticamente su manera normal de latir, por lo tanto el propio organelo debe manejar gran parte de la coordinación. La propagación de una onda de inclinación de los cilios a lo largo del axonema implica la unión y separación cíclica de cientos de brazos, lo que constituye una notable proeza.

Se han observado dos factores que influyen en la velocidad y orientación de los latidos ciliares o flagelares; estos son los iones Ca^{2+} y el AMP cíclico (AMPc). La acción de estos dos mensajeros químicos (véase capítulo 15) se puede ilustrar con el protozoo ciliado *Paramecium*. Este ciliado normalmente nada hacia adelante. Cuando encuentra un objeto en su camino, la dirección de los movimientos ciliares se invierte por sí sola (o sea, el golpe de poder se ejerce en la dirección opuesta), el ciliado nada hacia atrás y gira cambiando de dirección (fig. 9-43). A continuación, el ciliado inicia los latidos en una nueva dirección para avanzar hacia adelante. Este proceso continúa hasta que el cilia-

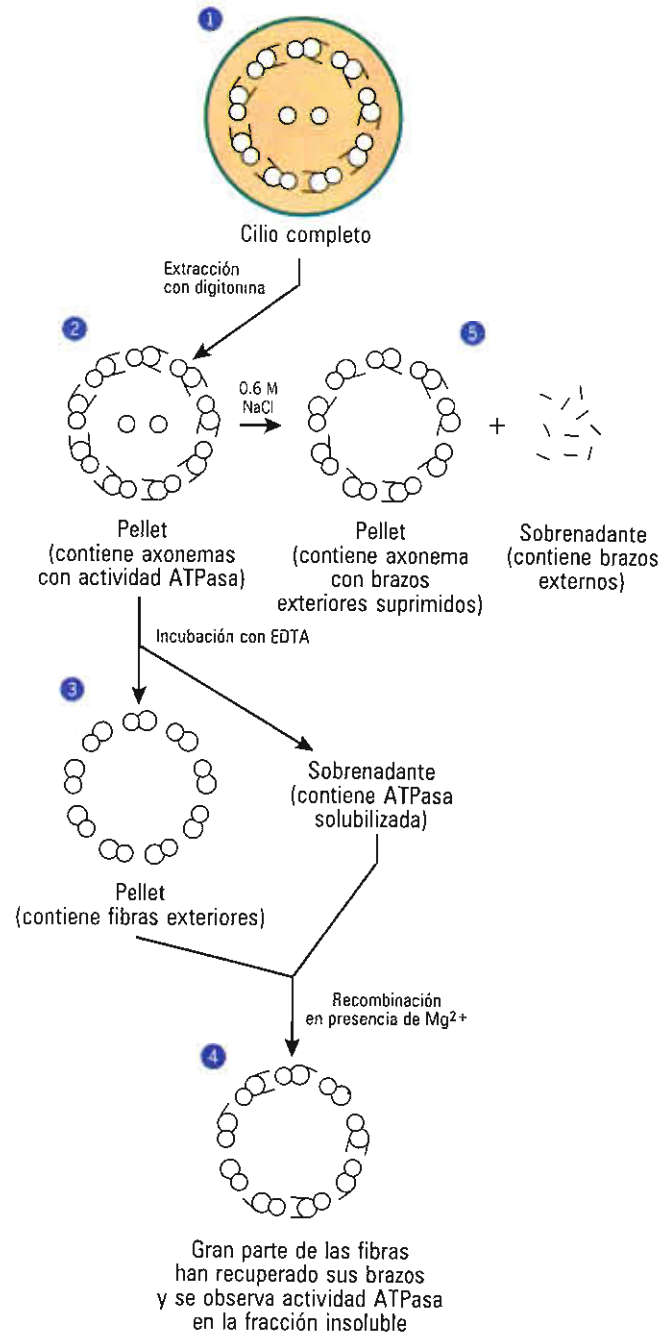


FIGURA 9-37. Etapas en la disección química del cilio del protozoo *Tetrahymena*. Las etapas numeradas se describen en el texto.

do orienta sus movimientos para evitar el objeto y nadar alejándose del mismo.

Mediciones electrofisiológicas indican que el contacto del ciliado con un objeto despolariza la membrana plasmática con la subsecuente apertura de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje. La entrada de iones calcio actúa (junto con el enlace del calcio a la proteína calmodulina) sobre el axonema para invertir la dirección de los latidos y el "retro-

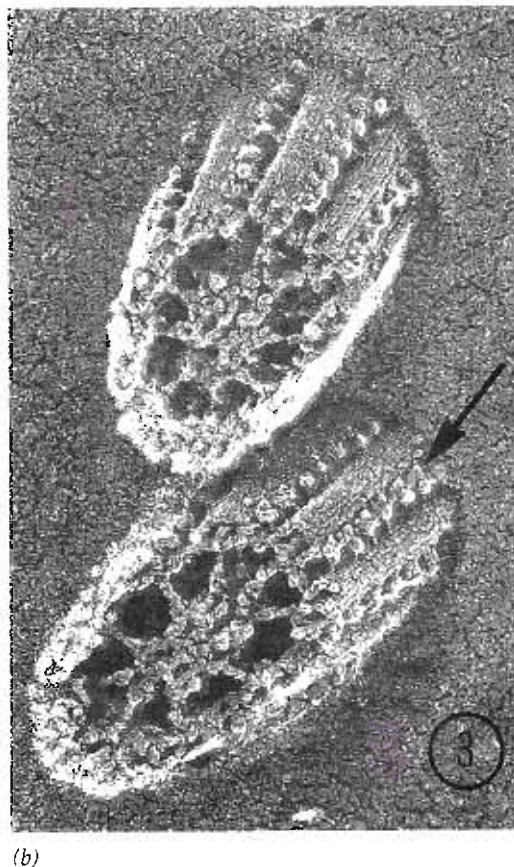
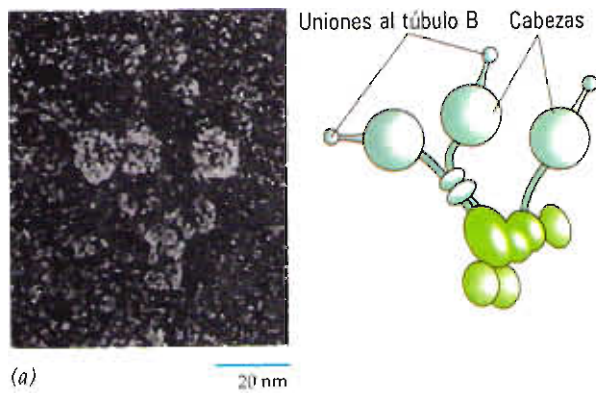


FIGURA 9-38. Dineína ciliar. a) Réplica en platino de sombreado rotatorio de una molécula de dineína del brazo flagelar externo preparada por microscopía de congelación rápida y agua fuerte profundo. Como se muestra en el dibujo acompañante, cada una de las tres cadenas pesadas forma una cabeza globular prominente con una extensión que funciona en el enlazamiento del brazo de dineína al doblete vecino. b) Micrografía electrónica de una réplica de axonemas de *Chlamydomonas* preparadas mediante congelación rápida, fractura y agua fuerte profundo. Se indica una hilera de brazos de dineína con la flecha. (a: Cortesía de John E. Heuser y Ursula W. Goodenough; b: según U.W. Goodenough y J.E. Heuser, J. Cell Biol. 95:800, 1982; con permiso de Rockefeller University Press.)

ceso" del ciliado. El cierre de las compuertas de calcio provoca descenso de la concentración de Ca^{2+} y retorno al desplazamiento hacia adelante.

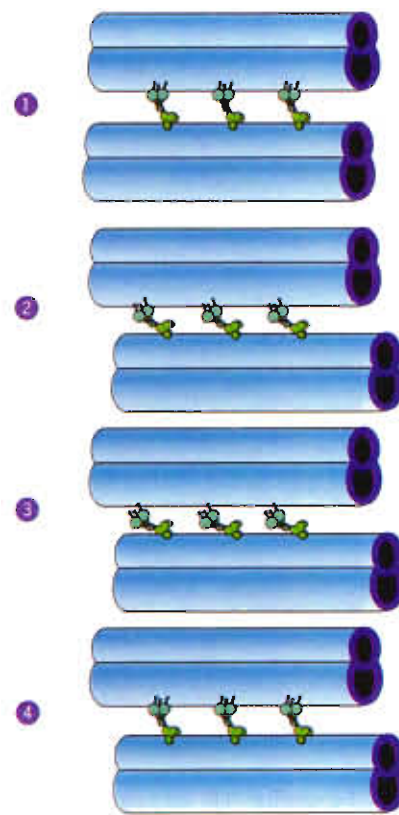


FIGURA 9-39. Papel de los brazos de dineína para generar la fuerza que impulsa la motilidad ciliar o flagelar. Las etapas se describen en el texto.

La velocidad del movimiento hacia adelante es regulada por la concentración de AMPc. Si el ciliado encuentra un agente estimulante, como alguna sustancia química que lo atraiga, los canales de K^+ se abren y la membrana se hiperpolariza, lo cual activa la enzima (adenililciclase) que sintetiza AMPc. La elevación de la concentración de AMPc desencadena la fosforilación de ciertas proteínas del axonema e incrementa la frecuencia de los latidos ciliares y acelera el movimiento hacia adelante. La aplicación directa de Ca^{2+} o de AMPc a los axonemas desmembrados simula la conducta apropiada que muestra una célula intacta, lo que indica que los efectores de estos mensajeros químicos forman parte de la propia estructura axonémica, pero los mecanismos detallados todavía no se han dilucidado.

9-4 Filamentos intermedios

Durante muchos años, el microscopio electrónico reveló la presencia de gran número de células con filamentos sólidos no ramificados, de superficie lisa y un diámetro de 10 nm, intermedio entre los microtúbulos y los microfilamentos. Dadas las dimensiones relativas de estas estructuras se les denominó **filamentos intermedios (FI)**. Los filamentos intermedios se ramifican a través del citoplasma de gran va-

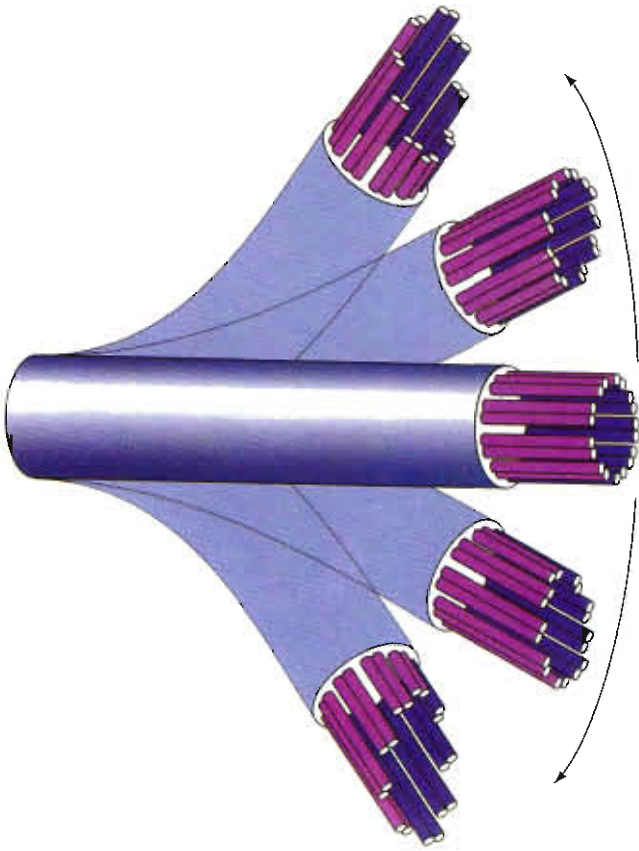


FIGURA 9-40. Mecanismo de la motilidad ciliar o flagelar mediante deslizamiento de microtúbulos. Diagrama del deslizamiento uno contra otro de microtúbulos vecinos. Cuando el cilio es recto, todos los dobletes externos terminan al mismo nivel (*centro*). La inclinación del cilio ocurre cuando los dobletes sobre un lado inclinado se deslizan más allá de los del otro lado (*arriba y abajo*). La fuerza causante del deslizamiento de microtúbulos vecinos se mostró en la figura previa.

riedad de células animales y con frecuencia muestran un patrón espacial semejante a microtúbulos con los cuales pueden conectarse (fig. 9-5). Hasta ahora, los filamentos intermedios sólo se han identificado con certeza en células animales.

A diferencia de microfilamentos y microtúbulos, los FI son un grupo de estructuras químicas heterogéneas codificadas en el ser humano cuando menos por 60 genes diferentes. Con base en su distribución en los tejidos (cuadro 9-2) y también según criterios bioquímicos, genéticos e inmunológicos, las subunidades de polipéptido de los FI se pueden dividir en seis clases principales. La mayor parte de estos polipéptidos, si no es que todos, comparten disposición similar de dominios que les permite formar filamentos muy parecidos. Lo más notable es que cada polipéptido contiene un dominio central α -helicoidal en forma de barra de longitud similar y secuencia homóloga de aminoácidos. Este dominio posee a cada lado dominios globulares de tamaño y secuencia variable (paso 1, fig. 9-44). Dos de estos poli-

péptidos interactúan espontáneamente conforme sus barras α -helicoidales se entrelazan en una bobina enrollada para formar un dímero parecido a una cuerda de 45 nm de longitud, aproximadamente (paso 2). Los dos polipéptidos se alinean paralelos entre sí con la misma orientación, por lo que el dímero presenta polaridad con un extremo definido por el C terminal de los polipéptidos y el extremo opuesto por el N terminal.

Ensamblado y desensamblado de filamentos intermedios

A diferencia de los microtúbulos y microfilamentos que se ensamblan siguiendo una sola vía, los filamentos intermedios al parecer pueden formarse en varias vías encargadas de sintetizar filamentos de espesor y número de subunidades variables. Además, el ensamblado de los FI no se acompaña de hidrólisis de nucleótidos. Se cree que la unidad básica de ensamblado es un tetrámero formado por dos dímeros que permanecen alineados lado a lado en disposición escalonada con sus extremos N y C terminales apuntando en dirección opuesta (antiparalela), como se muestra en la figura 9-44, paso 3. Puesto que los dímeros apuntan en dirección opuesta, el tetrámero carece de polaridad. Los tetrámeros se reúnen en ambos lados y ambos extremos para formar intermediarios mal descritos que se ensamblan para formar el filamento final (fig. 9-44, paso 4). Como los bloques de construcción tetraméricos carecen de polaridad, lo mismo ocurre con el filamento ensamblado, otra característica que distingue a los filamentos intermedios de otros elementos citoesqueléticos.

Igual que las fibras de colágena de la matriz extracelular, también compuesta de subunidades escalonadas, los filamentos intermedios son muy resistentes a fuerzas de tracción (ténsiles). La capa externa de la piel está formada por residuos de células epidérmicas muertas y consta casi por completo de una red de filamentos intermedios que contienen queratina. Estos filamentos confieren a la piel su resistencia al aire, agua, bacterias y la mayor parte de las sustancias químicas.

Los filamentos intermedios tienden a ser más estables a la fragmentación química que otros tipos de elementos citoesqueléticos y más difíciles de solubilizar empleando procedimientos leves de extracción. Sin embargo, una vez extraídos los filamentos intermedios utilizando detergentes iónicos, como dodecilsulfato de sodio, se pueden despolimerizar y repolimerizar repetidamente *in vitro*, lo que indica que las subunidades poseen toda la información necesaria para su autoensamblado. Gracias a su insolubilidad, inicialmente se pensó que los FI eran estructuras permanentes invariables, por lo que fue sorpresivo observar que muestran una conducta dinámica *in vivo*. Cuando se inyectan subunidades de queratina marcada en células de piel cultivadas, rápidamente se incorporan a los FI existentes. De manera sorprendente, las subunidades no se incorporan a los extremos del filamento, como podría esperarse a partir de estudios en microtúbulos y microfilamentos, sino más bien se incorporan al interior del filamento (fig. 9-45). Al principio, los filamentos sólo presentan moléculas mar-



FIGURA 9-41. Demostración experimental del deslizamiento de los microtúbulos. Se desmembró un espermatozoide de erizo marino y se reactivó con ATP, después se fotografió mediante múltiples exposiciones, como en la figura 9-36. En este experimento, se unieron globulitos de oro a los dobletes de microtúbulos externos expuestos, donde sirvieron como marcadores de sitios específicos a lo largo de los microtúbulos. Conforme el flagelo fue latiendo se pudieron observar las posiciones relativas de los globulitos. Como aquí se muestra, los globulitos se separan y luego se vuelven a reunir a medida que el flagelo ondula, indicando que los dobletes se deslizan hacia atrás y hacia adelante respecto uno de otro. (Según Charles J. Brokaw, *J. Cell Biol.* 114, cover #6, 1991; con permiso de Rockefeller University Press.)

cadadas en sitios dispersos a lo largo de su trayecto, pero más o menos en una hora toda la red de filamentos intermedios está marcada. Estos resultados sugieren que las células epidérmicas contienen una reserva de subunidades de queratina que, igual que los microtúbulos y los microfilamentos, se encuentra en equilibrio dinámico con la forma polimerizada. Se obtuvieron datos similares en filamentos intermedios de neuronas.

En algunas células también se puede observar la calidad dinámica de los filamentos intermedios conforme se inicia y concluye la mitosis. En este caso, los filamentos intermedios se desensamblan antes de la división celular y se reensamblan en las células hijas. En otros casos (como en las células epidérmicas queratinizadas), los FI permanecen polimerizados durante todo el periodo de división celular y simplemente se dividen junto con otros materiales del citoplasma. El ensamblado y desensamblado de algunos tipos de FI al parecer es controlado por la fosforilación y desfosforilación de las subunidades. Por ejemplo, la fosforilación de las subunidades desmina y vimentina inhibe notablemente su polimerización en los filamentos tipo III (cuadro 9-2).

Tipos y funciones de los filamentos intermedios

Los filamentos intermedios observados en células epiteliales (incluyendo células epidérmicas, hepatocitos y células acinares pancreáticas) se componen de dos tipos de queratina: tipo I (ácida) y tipo II (neutra y básica). Se han identificado unos 15 miembros de cada tipo de queratina. Los filamentos intermedios queratinizados siempre constan de heterodímeros que contienen un miembro de cada tipo de polipéptido de queratina. Los filamentos de queratina de las células epiteliales forman una elaborada red semejante a una canasta que rodea al núcleo y se ramifica a través del citoplasma (fig. 9-46). Muchos filamentos terminan en placas citoplásmicas de los desmosomas y hemidesmosomas que fijan estas células a otras células y a la membrana basal subyacente (págs. 251 y 258).

Además de microtúbulos y microfilamentos, el citoplasma de las neuronas se encuentra lleno de haces de filamentos intermedios laxamente empaquetados cuyos ejes largos se orientan en forma paralela al axón de la célula nerviosa (fig. 9-16). Estos filamentos intermedios, o *neurofilamentos* como



FIGURA 9-42. Demostración experimental de la presencia de un elemento proteínico en el axonema que se opone al deslizamiento. Micrografía en campo oscuro de axonemas sujetos a tratamiento proteolítico leve y luego reactivados mediante incubación con ATP. Se muestran dos axonemas donde se alargó varias veces su longitud normal debido al deslizamiento de dobletes externos que pasan uno sobre otro. (Según George B. Witman, J. Plummer y G. Sander, *J. Cell Biol.* 76:743, 1978; con permiso de Rockefeller University Press.)

se les denomina, se componen de por lo menos tres tipos distintos de proteínas (NF-L, NF-H y NF-M, todas del grupo tipo IV del cuadro 9-2) que se copolimerizan para formar el filamento intacto. Esta red de neurofilamentos tal vez constituya el principal componente del armazón estructural que apoya a los largos axones de una extensa neurona mielinizada.

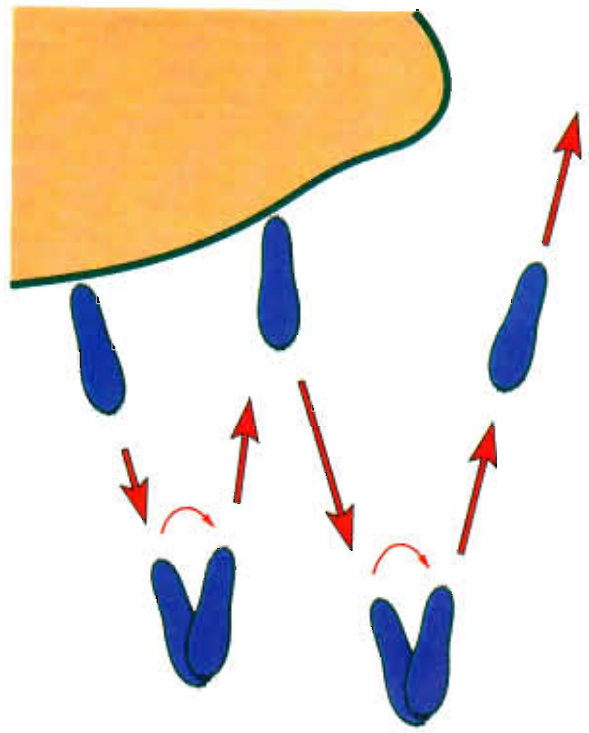


FIGURA 9-43. Conducta de prueba y error de *Paramecium*. Cuando el ciliado encuentra en su camino un objeto, los latidos de sus cilios se invierten y el organismo nada hacia atrás, luego gira aproximadamente 30° y nada hacia adelante otra vez. La maniobra se repite hasta que el camino está despejado. El mecanismo causante de esta respuesta se analiza en el texto.

Los intentos para demostrar las funciones de los diferentes tipos de filamentos intermedios no siempre han sido satisfactorios. En algunos de los primeros estudios, se inyectaron anticuerpos contra proteínas de filamentos intermedios en células cultivadas provocando una desorganización espectacular de la disposición normal de los FI, sin causar incapacidad fisiológica alguna evidente en las células tratadas. Esta observación, junto con el hecho de que los filamentos intermedios al parecer están ausentes en células vegetales, protistas y algunas células animales, sugiere que los filamentos intermedios no participan en procesos esenciales, como la mitosis y la citocinesis. En vez de ello, se concluyó que los FI proporcionan estabilidad mecánica a las células y realizan funciones especializadas en tejidos específicos. Los recientes esfuerzos para conocer la función de los filamentos intermedios se apoyan en ratones manipulados con ingeniería genética que producen polímeros FI alterados o mayores cantidades que lo normal del polipéptido de filamentos intermedios normal. Aunque estos estudios no aclaran necesariamente el papel preciso de los filamentos intermedios, ilustran la importancia de estas estructuras para la viabilidad de las células.

Los ratones transgénicos que producen polipéptidos de queratina alterada pueden mostrar problemas graves de salud. Por ejemplo, los ratones con pérdida del gene que codifica K14, un tipo de polipéptido I sintetizado normalmente por células de la capa epidérmica basal, son tan sen-

CUADRO 9-2. Propiedades y distribución de las principales proteínas filamentosas intermedias de mamífero

Proteína FI	Tipo de secuencia	Peso molecular promedio ($\times 10^{-3}$)	Número estimado de polipéptidos	Distribución primaria del tejido
Queratina	I	40-56.5	15	Epitelio
Queratina	II	53-67	15	Epitelio
Vimentina	III	57	1	Células mesenquimatosas
Desmina	III	53-54	1	Músculo
Proteína ácida fibrilar glial (PAFG)	III	50	1	Células gliales y astrocitos
Periferina	III	57	1	Neuronas periféricas
Proteínas neurofilamentosas				Neuronas de nervios periféricos y centrales
NF-L	IV	62	1	
NF-M	IV	102	1	
NF-H	IV	110	1	
Proteínas laminina				Todo tipo de célula
Laminina A	V	70	1	(Envolturas nucleares)
Laminina B	V	67	1	
Laminina C	V	60	1	
Nestina	VI	240	1	Células de estirpe neuronal

Adaptado de Kathryn Albers y Elaine Fuchs, *Int. Rev. Cytol.* 134:244, 1992.

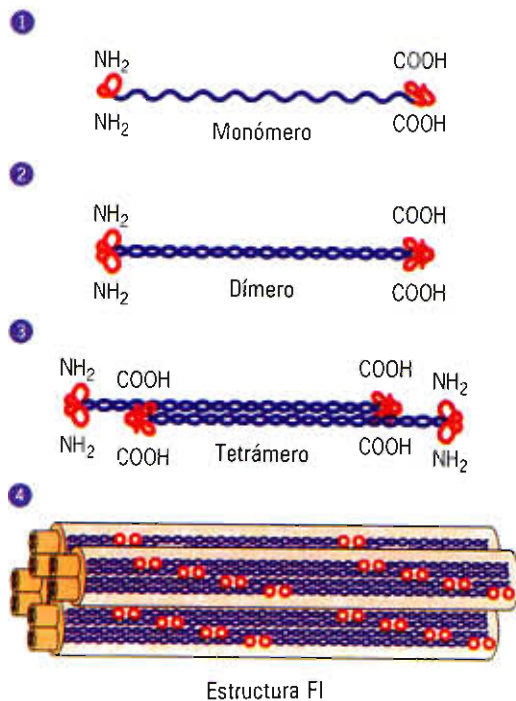


FIGURA 9-44. Modelo del ensamblaje y arquitectura del filamento intermedio. Cada monómero (paso 1) consiste en uno de una amplia variedad de diferentes polipéptidos que comparten organización similar al tener dominios terminales globulares separados por una larga región α -helicoidal. Los pares de monómeros se asocian en orientación paralela con sus terminaciones alineadas para formar dímeros (paso 2). Dependiendo del tipo de filamento intermedio, los dímeros pueden estar compuestos de monómeros idénticos (homodímeros) o no idénticos (heterodímeros). Los dímeros, en cambio, se asocian en forma escalonada antiparalela para formar tetrámeros (paso 3), que se supone son la subunidad básica de ensamblaje de los filamentos intermedios. La organización de las subunidades tetraméricas con el filamento se muestra en el paso 4.

sibles a la presión mecánica que incluso traumatismos leves, como el que ocurre durante el paso a través del conducto del parto o durante la lactancia del recién nacido, pueden causar ampollas graves sobre la piel o la lengua. Este fenotipo posee un fuerte parecido con una rara enfermedad del ser humano que causa ampollas cutáneas, denominada *epidermolisis bullosa simple (EBS)*. Análisis subsecuentes de pacientes con EBS demostraron que poseen mutaciones en el gen que codifica el polipéptido K14 homólogo (o el polipéptido K5 que forma dímeros con K14). Estos estudios confirman el papel de los FI para impartir fuerza mecánica a células situadas en las capas epiteliales.

En otros estudios se utilizaron ratones transgénicos cuyas células nerviosas producen tres o cuatro veces la cantidad normal de NF-L, un polipéptido de los neurofilamentos. La expresión excesiva de esta proteína conduce a la acumulación gradual de numerosos neurofilamentos, mayor que lo normal en el citoplasma de células nerviosas con degeneración axonal y atrofia muscular acompañantes (fig. 9-47). También se observa acumulación y ensamblaje anormal de neurofilamentos en nervios motores de pacientes con ciertas enfermedades neuromusculares degenerativas, incluyendo esclerosis lateral amiotrófica (o enfermedad de Lou Gehrig). Todavía falta por determinar si estas enfermedades neurodegenerativas se pueden explicar como resultado de mutaciones en los genes que codifican polipéptidos de neurofilamentos.

9-5 Microfilamentos

Las células muestran motilidad notable. Por ejemplo, la cresta neural de las células de un vertebrado sale del sistema nervioso en desarrollo y atraviesa toda la amplitud del embrión formando productos tan diversos como las células

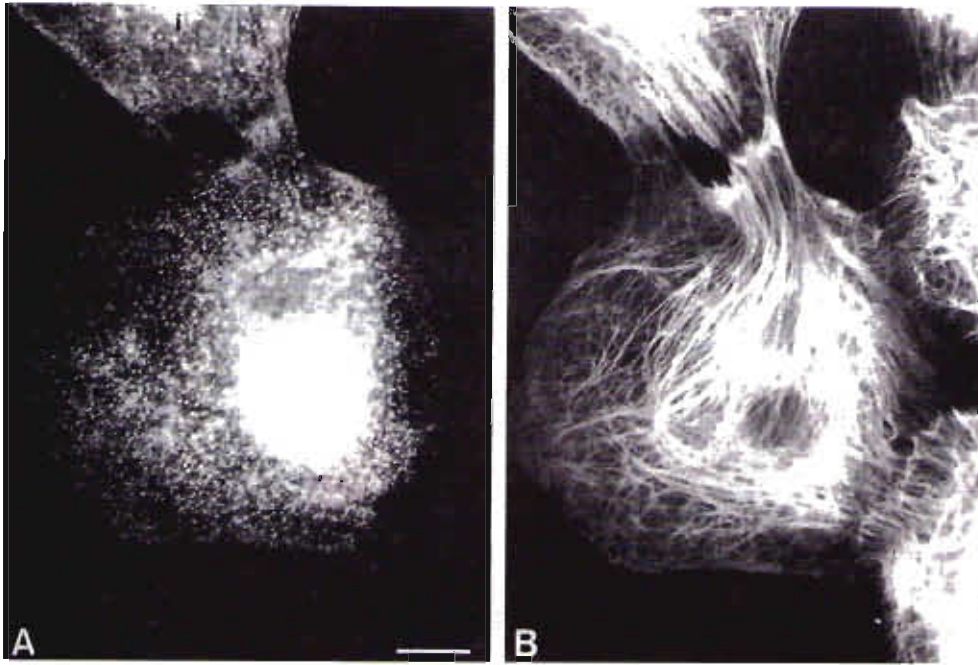


FIGURA 9-45. Demostración experimental del carácter dinámico de los filamentos intermedios. Estas fotografías muestran los resultados de un experimento en el cual se inyectó queratina tipo I marcada con biotina a células epiteliales cultivadas y 20 minutos más tarde se localizó utilizando inmunofluorescencia. La fotografía en *a* muestra el sitio de la queratina biotinilada inyectada (según lo revelan los anticuerpos antibiotina) que fueron incorporados a los filamentos durante el periodo de 20 minutos que siguió a la inyección. La fotografía en *b* muestra la distribución entre los filamentos intermedios en la célula como lo revelan los anticuerpos antikeratina. El patrón de puntos de fluorescencia en *a* indica que las subunidades inyectadas se incorporan a los filamentos existentes en sitios por toda su longitud más bien que en sus extremos. Barra, 10 μm . (Según Rita K. Miller, Karen Vikstrom y Robert D. Goldman, *J. Cell Biol.* 113:848, 1991; con permiso de Rockefeller University Press.)

pigmentadas de la piel y el cartílago de las mandíbulas (fig. 7-10). De manera similar, legiones de leucocitos patrullan los tejidos del cuerpo en busca de desperdicios y microorganismos. Algunas partes de las células muestran igual



FIGURA 9-46. Distribución de los filamentos intermedios que contienen queratina en células cultivadas de piel (queratinocito). Se observa que los filamentos forman una red similar a una caja que rodea al núcleo y también se extiende a la periferia de la célula. (Cortesía de Kursad Turksen y Elaine Fuchs, Universidad de Chicago.)

motilidad; en el borde de una herida, amplias prolongaciones de las células epiteliales actúan como dispositivos móviles que ayudan a empujar la capa de células sobre la región dañada y sellar la herida. De manera similar, el borde delantero de un axón envía prolongaciones microscópicas que reconocen el sustrato y guían a la célula hacia un objetivo sináptico. Todos estos diferentes ejemplos de motilidad comparten cuando menos un elemento común: dependen de la presencia de microfilamentos, que es el tercer tipo en importancia de elementos citoesqueléticos.

Los **microfilamentos** miden cerca de 8 nm de diámetro y se componen de la proteína **actina**. En 1990 se dio un gran paso en la investigación del citoesqueleto cuando Kenneth Holmes y sus colegas, del Max Planck Institute de Alemania, determinaron la estructura tridimensional de la actina del músculo de conejo a nivel de resolución atómica mediante cristalografía de rayos X. Cada molécula de actina tiene la forma de un cacahuete con dos dominios separados por una hendidura profunda y conectados entre sí por una corta sección o "bisagra" del eje longitudinal. En presencia de ATP, estas subunidades de actina, o **actina G**, se polimerizan siguiendo un patrón de cabeza y cola para formar un filamento flexible compuesto de dos cadenas de moléculas de actina entrelazadas en una doble hélice (fig. 9-48). Los términos "filamento de actina", "microfilamento", y "actina F" son todos sinónimos para este tipo de filamento de doble cadena. Puesto que cada subunidad de actina tiene polaridad y todas las subunidades del filamento de actina apun-

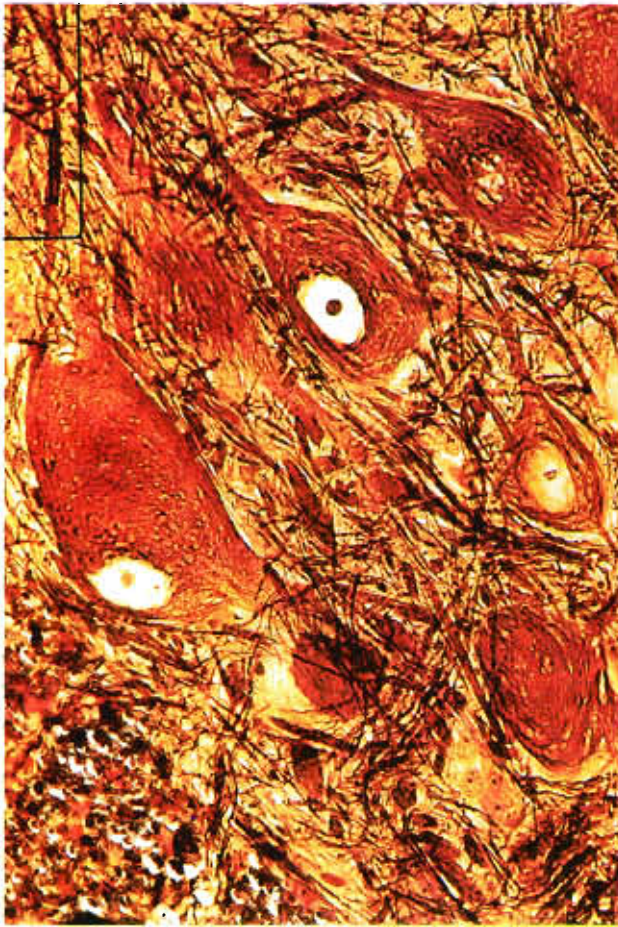


FIGURA 9-47. Efecto de la expresión excesiva de neurofilamentos polipéptidos. Micrografía de luz de un corte teñido con colorante argéntico de una porción de la médula espinal de un ratón transgénico que expresa excesivamente los genes que codifican al polipéptido del NF-L. Las motoneuronas de este ratón son anormales y contienen remolinos de neurofilamentos con corpúsculos celulares en forma de balón. (Según Z.S. Xu, L.C. Cork, J.W. Griffin y D.W. Cleveland, *Cell* 73, cover # 2, 1993, con permiso de Cell Press.)

tan en la misma dirección, el microfilamento entero también tiene polaridad. Según el tipo de célula y la actividad en la que participan los filamentos de actina, se pueden organizar en disposiciones altamente ordenadas, redes laxamente definidas o haces apretados.

La actina se identificó desde hace más de 50 años como una de las principales proteínas contráctiles de la célula muscular. Desde entonces, la actina se identifica como una proteína principal en casi todos los tipos de células eucariotas observadas. Las especies vegetales y animales evolutivamente elevadas poseen algunos genes que codifican actina, que en conjunto forman una familia de polipéptidos estrechamente relacionados cuyos miembros se especializan en diferentes tipos de motilidad. La estructura de la actina se ha conservado notablemente en todo el curso de la evolución. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de las moléculas de actina de células de levadura y del músculo esquelético de conejo son 88% idénticas. En realidad, los

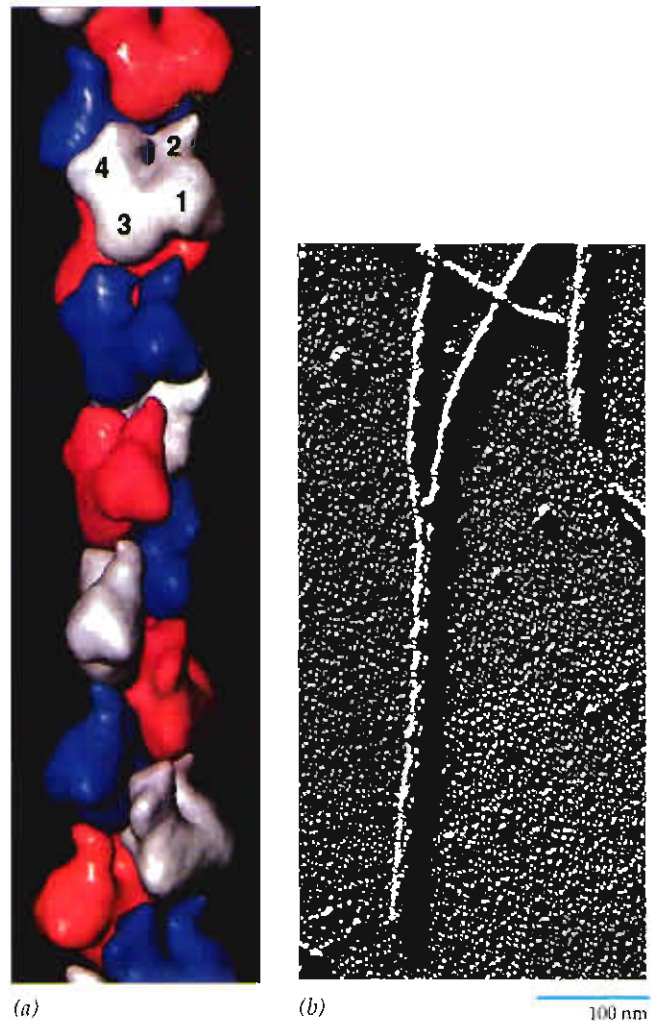


FIGURA 9-48. Estructura de un filamento de actina. a) Modelo de un filamento de actina F. Los monómeros de actina están representados en tres colores para distinguir subunidades consecutivas con mayor facilidad. Los subdominios en uno de los monómeros de actina están marcados 1, 2, 3 y 4. b) Micrografía electrónica de una réplica de un filamento de actina mostrando su arquitectura de doble hélice. (a: Según Michael F. Schmid y cols., cortesía de Wai Chiu, en *J. Cell Biol.* 124:346, 1994; con permiso de Rockefeller University Press; b: según Robert H. Depue, Jr. y Robert V. Rice, *J. Mol. Biol.* 12:302, 1965.)

filamentos de actina de diversas fuentes pueden copolimerizarse para formar filamentos híbridos.

La identificación de filamentos de actina en determinada célula se puede lograr utilizando una prueba citoquímica basada en que los filamentos de actina, cualquiera que sea su origen, interactúan de manera muy específica con la proteína miosina. Para facilitar la interacción se fragmenta miosina purificada (obtenida de tejido muscular) con una enzima proteolítica en dos o tres partes, una de las cuales [fragmento de meromiosina pesada (MMP) o su subfragmento S1 más pequeño, véase figura 9-53] se enlaza a las moléculas de actina a todo lo largo del microfilamento. Además de identificar los filamentos que contienen actina, la MMP o los fragmentos S1 se enlazan de modo que revelan la polaridad del fila-

mento. El extremo del microfilamento al cual se fijan los fragmentos de miosina tiene aspecto puntiagudo, y el otro extremo presenta púas. En la figura 9-49 se muestra la polaridad de los filamentos de actina en microvellosidades de células epiteliales del intestino “decoradas” con fragmentos de miosina S1. También se puede localizar actina con el microscopio de luz utilizando fragmentos S1 o anticuerpos anti actina marcados con colorantes fluorescentes (fig. 9-70, *a*).

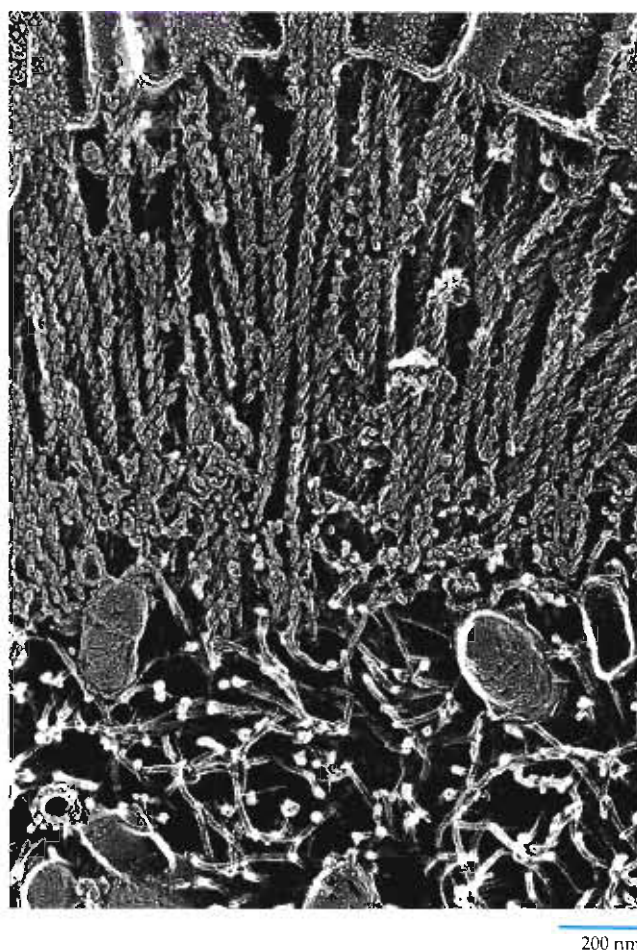
Ensamblado y desensamblado de microfilamentos

Los monómeros de actina deben enlazarse a un nucleótido de adenosina, por lo regular ATP, antes de polimerizarse. El papel del ATP en el ensamblado de la actina es similar al del GTP en el ensamblado de microtúbulos (pág. 344). El ATP relacionado con monómeros de actina se hidroliza a ADP en algún momento luego de su incorporación al filamento de actina en crecimiento. Por consiguiente, cuando las células están ensamblando filamentos de actina a gran velocidad, el extremo del filamento contiene un casquete de subunidades actina-ATP que impide el desensamblado del filamento y favorece su ensamblado continuo. En el tubo de ensaye es fácil lograr la polimerización y despolimerización de filamentos de actina, por lo que las condiciones que favorecen el ensamblado y desensamblado de microfilamentos es un proceso bien comprendido.

Cuando se incuban microfilamentos con monómeros de actina marcada en concentración elevada, ambos extremos de los microfilamentos quedan marcados, pero un extremo incorpora monómeros a una velocidad cinco a 10 veces mayor que la del otro extremo. La decoración con fragmento de meromiosina pesado revela que el extremo barbudo (o más) del microfilamento es el extremo que crece con mayor rapidez, en tanto que el extremo puntiagudo (o menos) crece con mayor lentitud (fig. 9-50, *a*). Inversamente, el extremo puntiagudo es el sitio preferencial de despolimerización. Puesto que los monómeros de actina tienden a añadirse al extremo más del filamento y abandonar su extremo menos, los monómeros individuales deben desplazarse siguiendo la longitud del filamento de actina, proceso conocido como “tráfico” (fig. 9-50, *b*). Falta por establecer si este tráfico ocurre realmente *in vivo*.

Igual que en los microtúbulos, las células conservan un equilibrio dinámico entre las formas monómera y polímera de actina. Los cambios en las condiciones locales de una porción particular de la célula pueden desviar el equilibrio hacia ensamblado o desensamblado de microfilamentos con importantes consecuencias para la conducta de esta parte de la célula. En las siguientes páginas se exploran numerosos ejemplos de la importancia del ensamblado y desensamblado de actina.

Como se mencionó antes, los filamentos de actina participan en casi todo tipo de procesos de movimiento en los cuales ocurren las células. La participación de estos filamentos se puede determinar con mayor facilidad tratando las células con una citocalasina, grupo de compuestos extraídos de células del moho que despolimerizan los microfilamentos, o con faloidina, compuesto extraído de hongos



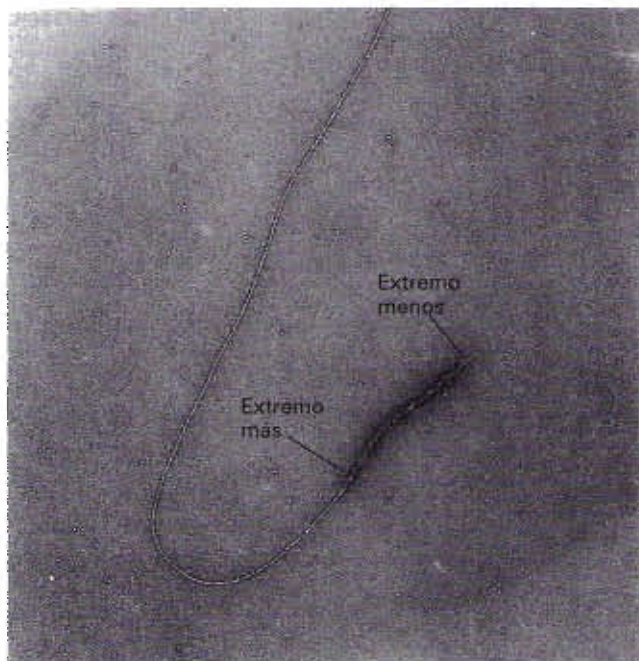
200 nm

FIGURA 9-49. Determinación de la ubicación de la polaridad de los filamentos de actina utilizando la subunidad S1 de miosina. Micrografía electrónica de una réplica que muestra los haces de microfilamentos en el centro de la microvellosidad de una célula epitelial intestinal. La célula se fijó, se trató con fragmentos de miosina S1, se fracturó por congelación y se sometió a agua fuerte profundo para exponer los componentes filamentosos del citoplasma. La orientación de las cabezas de flecha formadas por el complejo de actina S1 suministra información importante acerca de la dirección en la cual se mueven los microfilamentos. Los filamentos intermedios en la parte inferior de la micrografía no contienen actina y por lo tanto no se unen a los fragmentos de miosina S1. (Según N. Hirokawa, L.G. Tilney, K. Fujiwara y J.E. Heuser, J. Cell Biol. 94:430, 1982; con permiso de Rockefeller University Press.)

gos venenosos que estabiliza al microfilamento de manera que la célula ya no puede utilizarlos en sus actividades dinámicas. La exposición de las células a cualquiera de estos compuestos detiene casi de inmediato los procesos mediados por microfilamentos. En la figura 9-51 se muestra el efecto de la citocalasina sobre las más delgadas prolongaciones móviles (*filopodios*) de las células mesenquimatosas del erizo de mar.

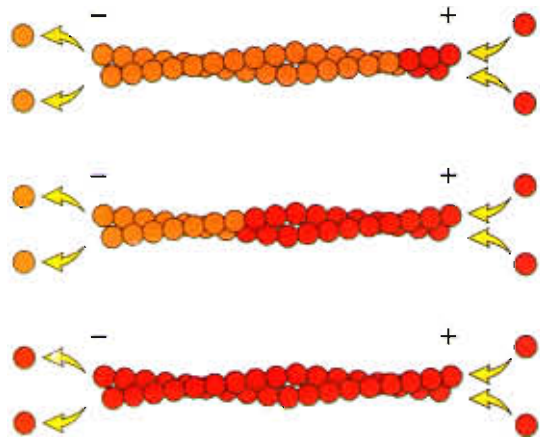
Polimerización de la actina como mecanismo generador de fuerza

Se ha demostrado que algunos tipos de motilidad celular se deben exclusivamente a la polimerización de la actina y



(a)

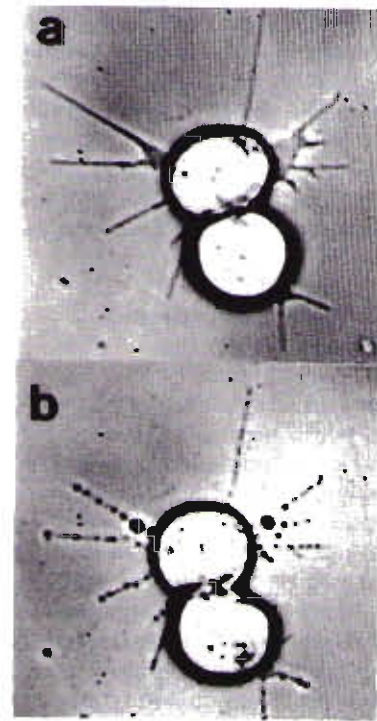
0.2 μm



(b)

FIGURA 9-50. Ensamblado de actina *in vitro*. a) Micrografía electrónica de un filamento corto de actina marcado con miosina S1 y luego utilizado para nuclear la polimerización de actina. La adición de subunidades de actina ocurre con mayor rapidez en el extremo barbudo (más) que en el puntiagudo (menos) del filamento existente. b) Diagrama de la adición preferencial de subunidades de actina en el extremo más de un microfilamento y su pérdida preferencial del extremo menos en un ensayo *in vitro*. Como resultado, las subunidades giran como rueda de molino a través del filamento *in vitro*. (a: Cortesía de M.S. Runge y Thomas D. Pollard.)

no afectan la acción de proteínas motoras. Consideraremos dos ejemplos. Durante los sucesos que preceden a la fertilización, las células del espermatozoide de muchas especies responden a la presencia cercana de un óvulo mediante una *reacción acrosómica* en la cual crecen finos filamentos de manera explosiva en el extremo frontal del espermatozoide. Estos *filamentos acrosómicos*, como se les denomina,



10 μm

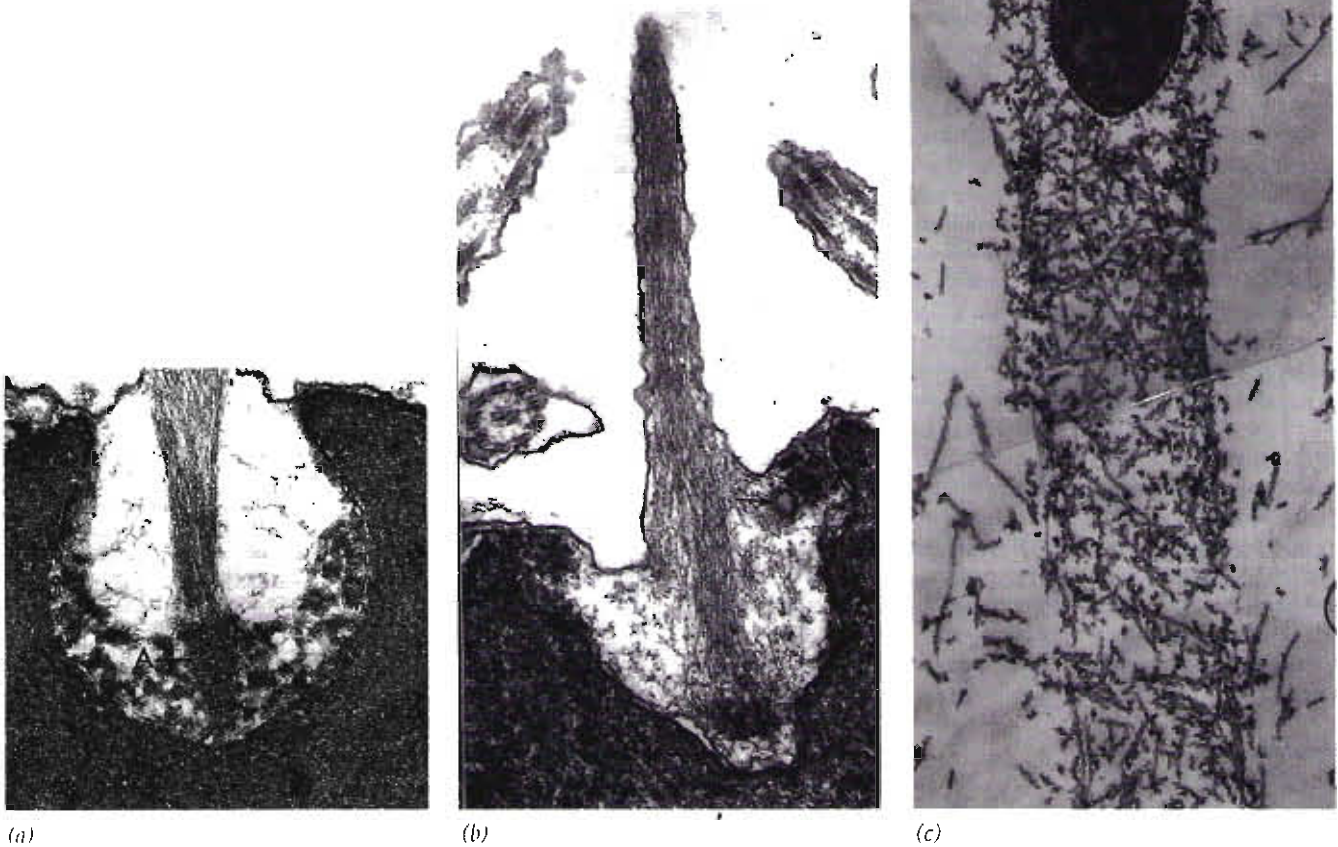
FIGURA 9-51. Efecto de la citocalacina sobre las estructuras que contienen filamentos de actina. Un par de células mesenquimatosas del erizo de mar con prolongaciones filamentosas finas (filopodio) luego de 30 segundos (a) y de cinco minutos (b) de exposición a citocalacina D. El fármaco provoca la disolución de la prolongación celular, que está compuesta principalmente de filamentos de actina. (Según Gerald Karp y Michael Solursh, *Dev. Biol.* 112:281, 1985.)

efectúan el contacto inicial con la superficie del óvulo. Los estudios de la reacción acrosómica en el pez pepino *Thyone*, efectuados por Lewis Tilney y sus colegas en la Universidad de Pennsylvania, demostraron que la rápida extensión del filamento (fig. 9-52, a,b) sólo es gobernada por la polimerización de actina G (actina globular) para formar actina F. En otro ejemplo bien estudiado, la propulsión de ciertas bacterias (p. ej., *Listeria monocytogenes*, que provoca envenamamiento alimentario) a través del citoplasma de un fagocito infectado, es impulsada por la polimerización de monómeros de actina de la célula huésped en una región justo por detrás de la célula bacteriana (fig. 9-52, c). Estos procesos de motilidad operados por actina son ejemplos raros; prácticamente todos los otros tipos de motilidad celular implican la acción de una segunda proteína, la miosina.

Miosina: molécula motora de los filamentos de actina

Anteriormente se examinó la estructura y acciones de dos motores moleculares, cinesina y dineína, que operan sobre vías en los microtúbulos. Hasta ahora todos los motores conocidos que operan junto con filamentos de actina son miembros de la superfamilia miosina. Inversamente, la única

FIGURA 9-52. Dos ejemplos de motilidad celular basados únicamente en la polimerización de la actina. La rápida extensión del filamento acrosómico en el extremo anterior del espermatozoide de una cucurbitácea marina ocurre conforme la actina G almacenada en la cabeza del espermatozoide (a) es polimerizada para formar actina F (b). c) Micrografía electrónica de una célula infectada con la bacteria *Listeria*, mostrando los filamentos de actina que se forman detrás de ella y empujan a la bacteria a través del citoplasma. Los filamentos de actina tienen aspecto velludo debido a que están decorados con cabezas de miosina. La barra en la parte superior izquierda, 0.1 μm . (a-b: Cortesía de Lewis G. Tilney; c: según Lewis G. Tilney y cols. J. Cell Biol. 118:77, 1992; con permiso de Rockefeller University Press.)



función conocida de la miosina es actuar como sistema generador de fuerza en presencia de actina. Todas las miosinas estudiadas se mueven hacia el extremo más de los microfilamentos. Falta por determinar si las células contienen o no motores moleculares que se muevan hacia el extremo menos del microfilamento.

La miosina se aisló por primera vez del tejido muscular esquelético de mamíferos y posteriormente de gran variedad de células eucariotas, incluyendo protozoarios, vegetales evolutivamente elevados, células no musculares de animales, y tejido muscular cardíaco y liso de vertebrados. Las miosinas por lo general se dividen en dos clases: la miosina

convencional (tipo II) y la no convencional (tipo I).³ Ambos tipos de miosina se presentan juntas en muchas células eucariotas (fig. 9-78). Las moléculas de tipo II son las mejor conocidas de los dos tipos.

³ Con el descubrimiento de una variedad creciente de miosinas procedentes de diversas fuentes, cada vez es más difícil clasificarlas sólo en dos grupos. Todas las miosinas comparten un dominio motor característico (cabeza) que contiene ATP y sitios para enlace de actina F, pero también poseen dominios altamente divergentes en la cola y un número variable de cadenas ligeras. En algunas clasificaciones se consideran siete o más clases de miosina.

Miosina II

Las proteínas del tipo de miosina II generan fuerza en diferentes tipos de tejido muscular y también en varias actividades no musculares, incluyendo división de una célula en dos mediante citocinesis. Cada molécula de miosina II consta de seis cadenas de polipéptido (un par de cadenas pesadas y dos pares de cadenas ligeras) organizadas para producir una proteína altamente asimétrica (fig. 9-53, a). Cada molécula contiene una larga cola en forma de varilla fija a un extremo de dos cabezas bulbosas globulares. La cola está formada por el entrelazamiento de secciones α -helicoidales de las dos cadenas pesadas para formar una espiral α -helicoidal enrollada (pág. 59). La disección de la molécula de miosina mediante procedimientos leves de digestión proteolítica produce varios fragmentos, indicados en la figura 9-53, b. Los dos sitios susceptibles a proteasas en la cola son porciones no helicoidales de la cadena pesada que se cree actúan como “bisagras” flexibles que ayudan en las funciones motoras en la molécula.

En un ensayo de motilidad *in vitro*, similar al de la figura 9-54, cabezas aisladas de miosina (fragmentos S1 de la figura 9-53, b) inmovilizadas sobre la superficie de un cubreobjetos de vidrio pueden provocar deslizamiento de los filamentos de actina a los cuales están fijos. Por lo tanto, todo el mecanismo requerido para la actividad motora está incluido en un solo dominio de la cabeza. La porción fibrosa de la cola de una molécula de miosina II media el ensamblado de miosina en filamentos. Las moléculas de miosina se ensamblan de modo que los extremos de las colas apunten hacia el centro del filamento y las cabezas globulares se alejen del mismo (figs. 9-55 y 9-58). Por esta razón, el filamento se describe como *bipolar* para indicar una inversión de la polaridad a partir del centro del filamento. Como se describe en la siguiente sección, los filamentos de miosina que se ensamblan en las células de músculo esquelético son componentes muy estables del aparato contráctil, en tanto que los filamentos más pequeños de miosina que forman la mayor parte de las células no nucleares con frecuencia son estructuras transitorias que se ensamblan en el sitio y momento que se necesitan y se desensamblan después de actuar.

Miosina I

En 1973, Thomas Pollard y Edward Korn, de los National Institutes of Health (NIH), de Estados Unidos, describieron una proteína similar a miosina extraída del protozoario *Acanthamoeba*. A diferencia de las miosinas convencionales, esta miosina más pequeña sólo tiene una cabeza y es incapaz de formar filamentos por polimerización *in vitro*. Desde entonces se aislaron en varios tipos de células otras miosinas de una sola cabeza y dominios de cola muy variables que se agruparon para formar la miosina clase I. Las proteínas de la miosina I constan de una sola cadena pesada y una o más cadenas ligeras. Igual que las miosinas II, la miosina I puede generar *in vitro* un movimiento dependiente de ATP a lo largo de filamentos de actina.

El mejor conocimiento de la función de las miosinas clase I proviene de estudios efectuados en células manipuladas por ingeniería genética del moho del fango *Dictyostelium*, cuyo único gen miosina II se puede borrar o supri-

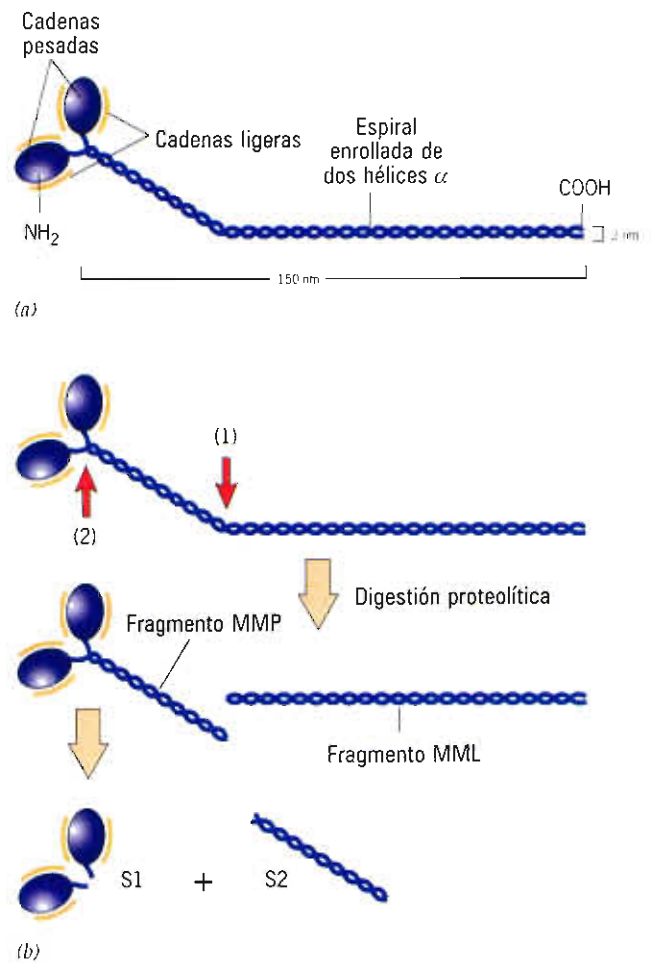


FIGURA 9-53. Estructura de una molécula de miosina II. a) Una molécula de miosina II (peso molecular de 460 000 daltons) consta de un par de cadenas pesadas y dos pares de cadenas ligeras, según se indica. Los pares de cadenas pesadas constan de una cola en forma de barra en la cual las porciones de las dos cadenas de polipéptidos se entrelazan para formar una espiral enrollada y un par de cabezas globulares. b) Cada molécula contiene dos sitios a lo largo del bastón, sensibles a proteasa. Estas dos regiones susceptibles se presentan como sitios de estructura no helicoidal que dan a la molécula flexibilidad y actúan como una especie de bisagra. El desdoblamiento de la cola en el sitio 1 genera dos fragmentos: meromiosina ligera (MML) y meromiosina pesada (MMP). El desdoblamiento de la MMP en el sitio 2 genera dos tipos de fragmentos, uno de los cuales es la cabeza S1 que contiene la proteína con actividad motora.

mir funcionalmente. Las células tratadas de esta manera sólo expresan miosina I, pero tienen capacidad de locomoción y fagocitosis normales. Sin embargo, estas células no pueden dividirse, puesto que la separación del citoplasma en dos partes (citocinesis) depende de manera estricta de miosina II.

Los anticuerpos fluorescentes contra miosina I tienden a localizarse cerca de la membrana plasmática, lo que apoya la hipótesis de que estas moléculas de miosina de una sola cabeza generan fuerzas a nivel de la superficie de la célula (fig. 9-78). La miosina I también se encuentra asociada a organelos membranosos y se cree que es la proteína

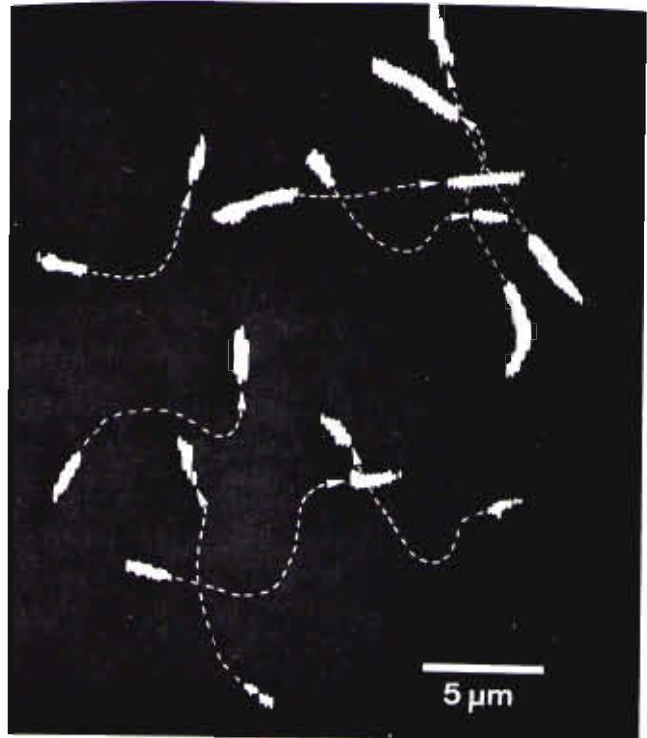
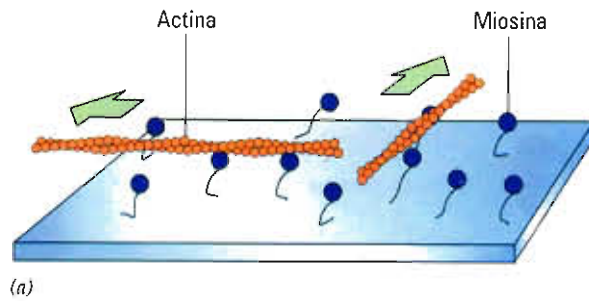
motora que desplaza vesículas citoplásmicas a lo largo de vías constituidas por microfilamentos. Iniciaremos el examen de la contractilidad y el movimiento celular en el sistema mejor estudiado, la célula del músculo esquelético de los vertebrados.

9-6 Contractilidad muscular

El músculo esquelético debe su nombre a que casi todo este tejido se encuentra anclado a los huesos del esqueleto que desplaza. Está bajo control voluntario y la contracción se puede efectuar de manera consciente. Las células del músculo esquelético tienen estructura altamente dispuesta. Una célula muscular única de forma cilíndrica tiene 10 a 100 μm de espesor y hasta 40 mm de longitud, y contiene cientos de núcleos. Debido a estas propiedades, la célula muscular esquelética se denomina con mayor propiedad **fibra muscular**. Las fibras musculares poseen múltiples núcleos porque cada fibra es producto de la fusión en el embrión de gran número de mioblastos mononucleados (células pre-musculares). La fusión de mioblastos mononucleados ocurre con facilidad en un plato de cultivo, aunque los mioblastos se obtengan de animales evolutivamente distantes (fig. 9-56).

Las células del músculo esquelético quizá tengan la estructura más ordenada de todas las células del cuerpo. Una sección transversal de una fibra muscular (fig. 9-57) revela que se asemeja a un cable formado por cientos de fibras cilíndricas delgadas, denominadas **miofibrillas**. Las miofibrillas están separadas entre sí por el citoplasma que contiene un elaborado sistema de membranas intracelulares y también un mecanismo para el suministro de energía constituido por mitocondrias, gotas de grasa y gránulos de glucógeno. Cada miofibrilla consta de disposición lineal repetitiva de unidades contráctiles denominadas **sarcómeros**; cada sarcómero está provisto de un patrón característico de bandas y líneas que dan a la fibra muscular un aspecto **estriado**. El examen de fibras musculares teñidas en el microscopio electrónico muestra que el patrón de bandas es consecuencia de la superposición parcial de dos tipos diferentes de filamentos, conocidos como **filamentos delgados** y **filamentos gruesos** (fig. 9-58). Cada sarcómero se extiende desde una línea Z a la siguiente línea Z y contiene varias bandas oscuras y zonas claras. Una sarcómera posee un par de **bandas I** levemente teñidas localizadas en los bordes externos, y una **banda A** más densamente teñida localizada entre las bandas I y la **zona H** levemente teñida, localizada en el centro de la banda A. Una **línea M** densamente teñida se sitúa en el centro de la zona H. La banda I sólo contiene filamentos delgados, la zona H sólo filamentos gruesos, y la parte de la banda A situada a los dos lados de la zona H representa la región de superposición y contiene ambos tipos de filamentos.

Una sección transversal a través de la región de superposición muestra que los filamentos delgados se organizan en disposición hexagonal alrededor de cada filamento grueso, en tanto que cada filamento delgado se sitúa entre dos filamentos gruesos (fig. 9-58). La sección longitudinal revela la presencia de prolongaciones de filamentos gruesos a



(b)

FIGURA 9-54. Ensayo de motilidad *in vitro* para miosina. a) Dibujo esquemático, en el cual las cabezas de miosina se enlazan a un cubreobjetos recubierto de silicón que posteriormente se incubó con una preparación de filamentos de actina. b) Resultados del experimento mostrado en a. La imagen proviene de dos tomas de video separadas 1.5 segundos, fotografiadas con doble exposición sobre el mismo cuadro de película. Las líneas punteadas con flechas muestran el movimiento de los filamentos de actina sobre las cabezas de miosina durante un breve periodo entre las exposiciones. (Según T. Yanagida, *Adv. Biophysics* 26:82, 1990.)

intervalos regularmente espaciados. Estas prolongaciones representan puentes transversales capaces de formar uniones con los filamentos delgados vecinos.

Modelo de contracción muscular de filamentos deslizantes

Todos los músculos esqueléticos ejecutan su función mediante acortamiento; no tienen otra manera de efectuar tra-

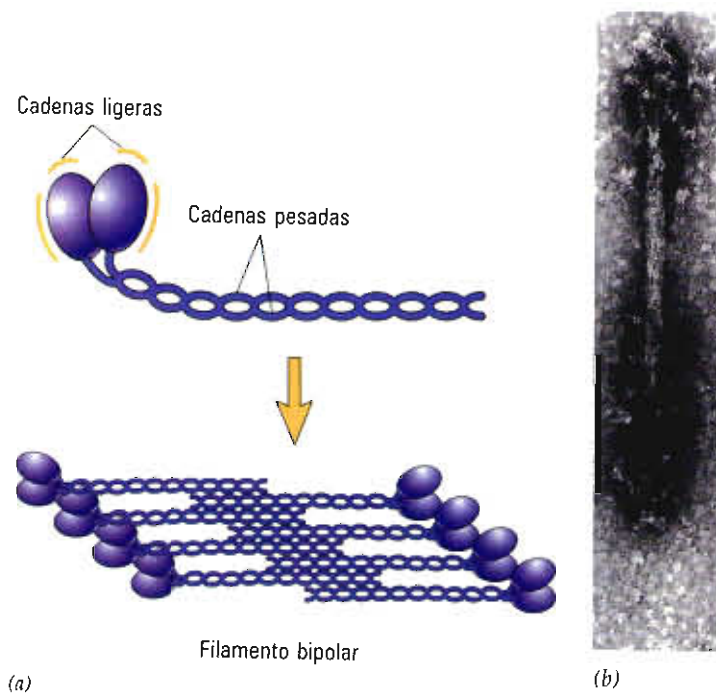


FIGURA 9-55. Estructura de un filamento bipolar de miosina II. a) Diagrama de la disposición de las moléculas individuales de miosina en el filamento de miosina II. b) Micrografía electrónica de un filamento bipolar de miosina formado *in vitro*. Se observan cabezas de filamento en ambos extremos, que dejan una sección lisa en el centro del filamento. (b: Cortesía de Hugh Huxley.)

bajo. Las unidades de acortamiento son las sarcómeras, cuya disminución de longitud combinada explica la reducción de longitud de todo el músculo. Los datos más importantes acerca del mecanismo subyacente de la contracción muscular provienen de observar el patrón de bandas en las

sarcómeras durante diferentes etapas del proceso contráctil. Conforme la fibra muscular se acorta, la banda A de cada sarcómera conserva prácticamente su misma longitud, en tanto que la banda H y las bandas I disminuyen de anchura y luego desaparecen en conjunto. A medida que el acortamiento progresa, las líneas Z se aproximan cada vez más al borde externo de la banda A hasta que entran en contacto (fig. 9-59).

Según este tipo de observaciones, dos grupos de investigadores británicos, Andrew Huxley y R. Niedergerke, y Hugh Huxley y Jean Hanson elaboraron un modelo de gran alcance para explicar la contractilidad muscular. Propusieron que el acortamiento de sarcómeras individuales no es resultado del acortamiento de los filamentos, sino más bien de su deslizamiento uno sobre el otro. El deslizamiento de los filamentos delgados hacia el centro de la sarcómera daría como resultado el incremento de la superposición observado entre los filamentos y la disminución de anchura de las bandas I y H (fig. 9-59). El modelo de filamentos deslizantes fue rápidamente aceptado y aún se siguen acumulando datos a su favor.

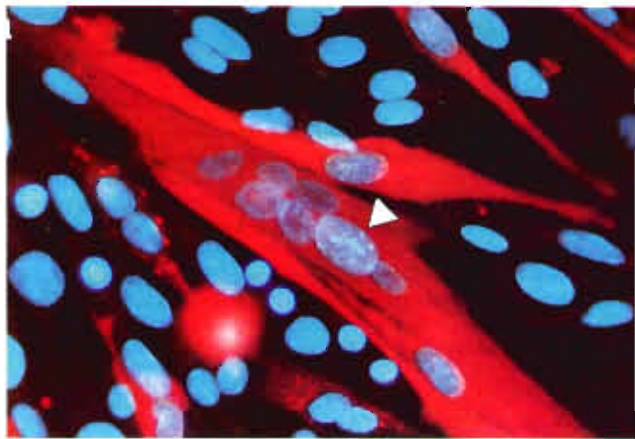


FIGURA 9-56. Demostración en cultivo de células que las células del músculo esquelético se originan de la fusión de células. Las células musculares aquí mostradas (denominadas miotubos cuando estaban en cultivo) se ve que contiene dos tipos diferentes de núcleos. Estos miotubos se originan de la fusión de dos tipos de células musculares mononucleares precursoras (mioblastos), un tipo derivado de una estirpe celular de ratón y la otra de codorniz. El triángulo indica el núcleo de un miotubo híbrido de ratón. Las fibras musculares en el cuerpo se originan por un proceso similar de fusión de mioblastos. (Según M. Crescenzi, D.H. Crouch y F. Tatò, J. Cell Biol. 125:1142, 1994, con permiso de Rockefeller University Press.)

Composición y organización de los miofilamentos

Los filamentos delgados de una sarcómera constan principalmente de actina, en tanto que los filamentos gruesos contienen principalmente miosina. La tercera proteína más abundante en la fibra muscular esquelética es la titina, cuyo peso molecular de casi tres millones de daltons y su longitud de más de $1\ \mu\text{m}$ la hacen la proteína más grande hasta ahora descubierta. Las moléculas de titina se originan en la línea M y se extienden a lo largo del filamento de miosina, atraviesan la banda A y terminan en la línea Z (fig. 9-60). Debido a su disposición, la titina se considera una tercera

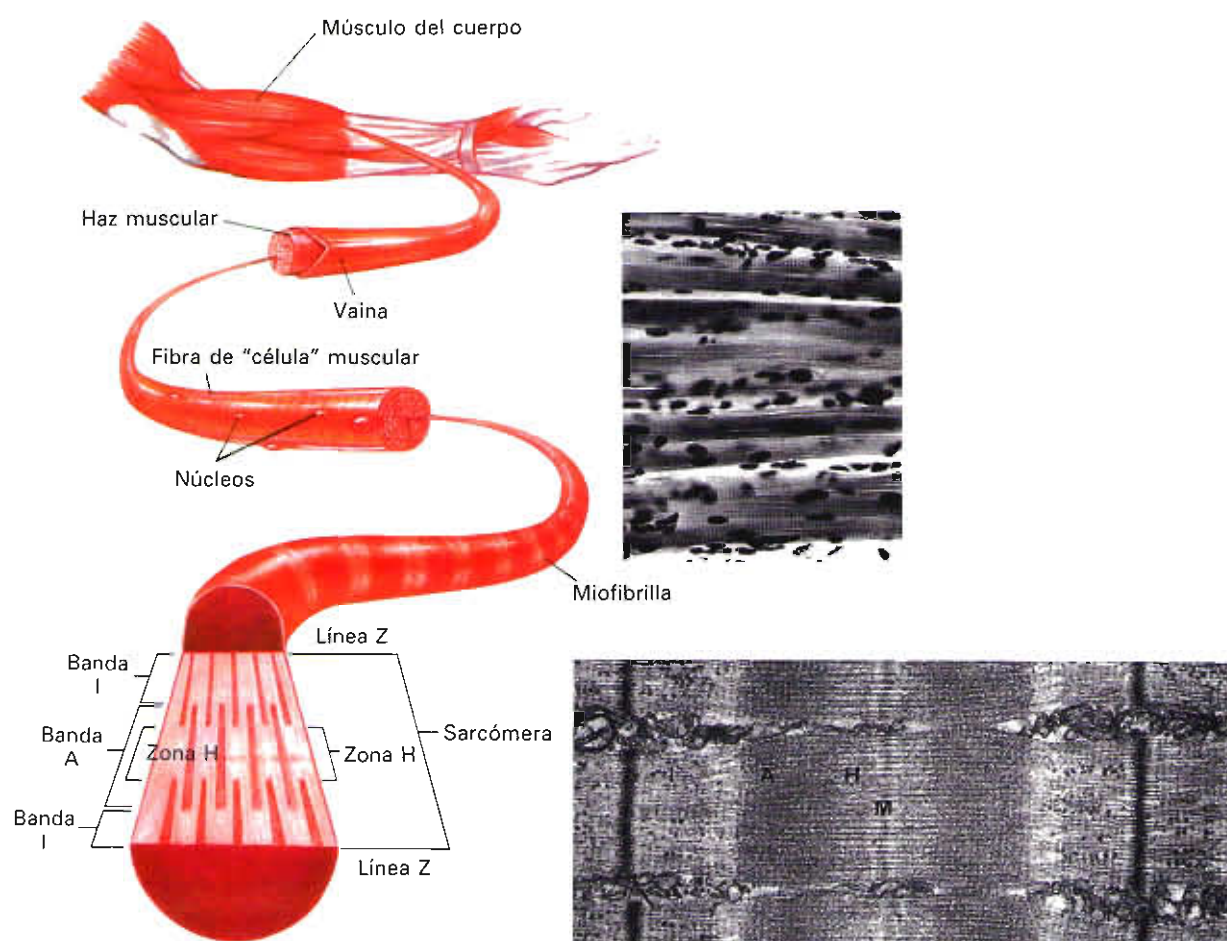


FIGURA 9-57. Estructura del músculo esquelético. Diagrama de los niveles de organización del músculo esquelético, desde un músculo corporal completo hasta una sencilla sarcómera. El primer recuadro muestra una micrografía con microscopio de luz de una fibra muscular multinucleada. El segundo recuadro muestra una micrografía electrónica de una sencilla sarcómera única con letras en las bandas. (Micrografías cortesía de Geraldine F. Gauthier.)

clase de filamento muscular. La titina es una molécula muy elástica (se puede estirar hasta una longitud mayor de 3 μm) y tal vez se encargue de ejercer el pequeño grado de tensión desarrollado por un músculo relajado y de mantener la posición de los filamentos de miosina en el centro de la sarcómera.

Además de actina, los filamentos delgados de un músculo esquelético contienen otras dos proteínas, tropomiosina y troponina (fig. 9-61). La tropomiosina es una molécula alargada (unos 40 nm de longitud) que se adapta firmemente a los surcos situados entre las dos cadenas de actina del filamento delgado. Cada molécula de tropomiosina en forma de barra se acompaña de siete moléculas de actina dispuestas linealmente a lo largo de la cadena F de actina (fig. 9-61). Las moléculas de tropomiosina se sitúan cabo a cabo a lo largo de todo el filamento delgado. La troponina es una proteína globular compuesta de tres subunidades, y cada una desempeña un papel importante y distinto en la función total de la molécula. Las moléculas de troponina se encuentran a intervalos de casi 40 nm a lo largo de los fila-

mentos delgados y entran en contacto con los elementos de actina y tropomiosina del filamento.

Cada filamento grueso se compone de varios cientos de moléculas de miosina y de pequeñas cantidades de otras proteínas. Igual que los filamentos formados *in vitro* (fig. 9-55), los filamentos gruesos de las células musculares invierten su polaridad en el centro de la sarcómera, que corresponde a la línea M de la figura 9-57. El centro del filamento contiene regiones de colas opuestas de las moléculas de miosina y está desprovisto de cabezas. Las cabezas de miosina se proyectan a partir de cada filamento grueso a lo largo de casi toda su longitud, debido a la posición escalonada de las moléculas de miosina que constituyen el cuerpo del filamento (fig. 9-58).

Bases moleculares de la contracción

Luego de formulada la hipótesis de los filamentos deslizantes se volvió la atención a las cabezas de las moléculas de miosina como componentes generadores de fuerza de la fibra muscular. Cuando llega la orden, las cabezas de

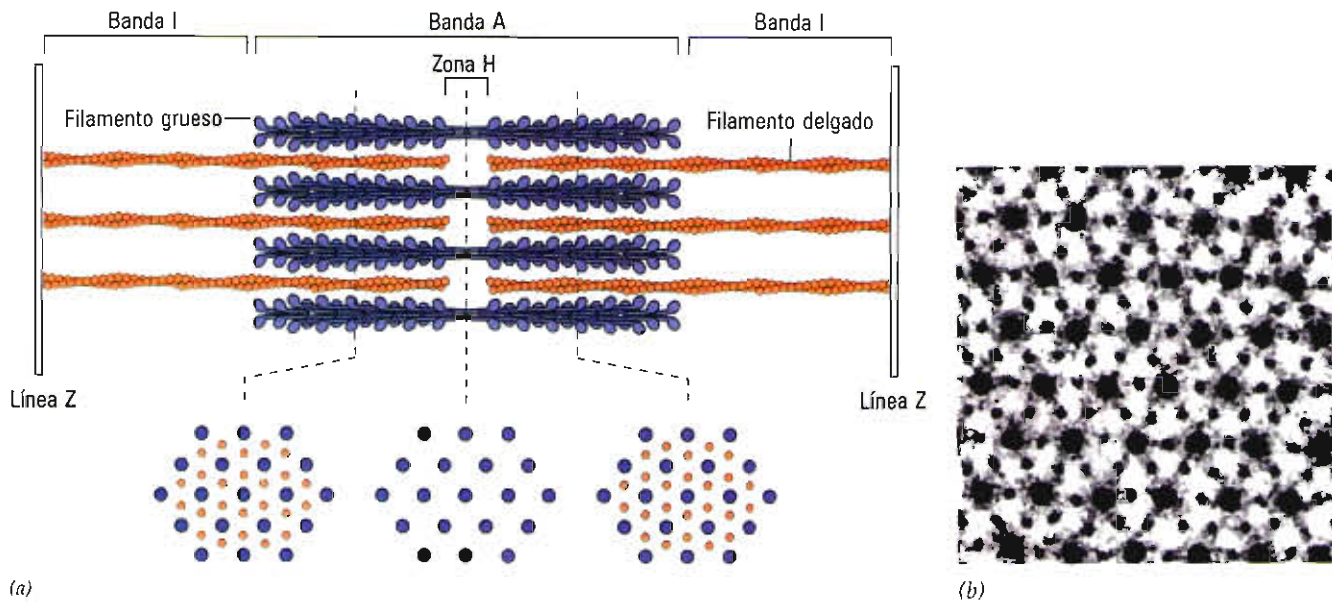


FIGURA 9-58. Mecanismo contráctil de la sarcómera. a) Diagrama de una parte de la miofibrilla que muestra la disposición superpuesta de filamentos delgados que contienen actina (color naranja) y filamentos gruesos que contienen miosina (color púrpura). Las pequeñas prolongaciones transversales sobre la fibra de miosina representan las cabezas (puentes transversales). b) Micrografía electrónica de una sección transversal a través de una parte del músculo del insecto volador mostrando la disposición hexagonal de los filamentos delgados alrededor de cada filamento grueso. (b: Micrografía por J. Auber/Photo Researchers, Inc.)

miosina se extienden lateralmente para hacer contacto con los filamentos delgados, formando los puentes transversales observados entre los dos tipos de filamentos. Las cabezas de un solo filamento de miosina interactúan con seis filamentos de actina que las rodean. Una vez formados los puentes transversales, las cabezas de miosina se inclinan hacia el centro de la sarcómera (fig. 9-62, paso 4). El movimiento de las cabezas de miosina actúa como latido de potencia para deslizar el filamento de actina delgado una distancia perceptible sobre el filamento grueso.

Durante una contracción típica, la fibra muscular se acorta casi 65% de la longitud que presenta en estado de relajación (fig. 9-59). Puesto que cada sarcómera tiene casi $2.5\ \mu\text{m}$ de longitud, sería de esperar que los filamentos delgados se deslicen aproximadamente $1\ \mu\text{m}$ durante la contracción. Dado que el simple cambio de conformación de una cabeza de miosina sólo puede mover un filamento de actina unos 5 a 10 nm, una sola contracción requiere una serie repetida de interacciones entre los puentes transversales y los filamentos delgados. Se estima que un puente transversal determinado puede sufrir 50 a 100 ciclos mecánicos por segundo.

Energética del filamento deslizando

La energía requerida para impulsar el cambio de conformación en el puente transversal se obtiene de la hidrólisis de ATP mediante una ATPasa presente en el mismo puente transversal. La miosina, que es al mismo tiempo proteína estructural y enzima, es ideal para esta tarea. La parte en forma de barra de la molécula le permite formar filamentos, requeridos para mantener los puentes transversos en posi-

ción espacial rígida en los intervalos apropiados. Las cabezas de miosina sirven como catalizadores de la hidrólisis de ATP y como palancas del movimiento de filamentos de actina. Por lo tanto, igual que otras proteínas motoras, cinesina y dineína, la miosina actúa como transductor quimiomecánico que convierte la energía química del ATP en la energía mecánica de un filamento deslizando.

Cada ciclo de actividad mecánica del puente transversal de miosina se acompaña de un ciclo de actividad de la ATPasa, según se ilustra en la figura 9-62 y se describe en el pie de figura. En el paso 1 de la figura 9-62, el ATP se enlaza a la cabeza de miosina. La hidrólisis del ATP ocurre en realidad antes que la cabeza de miosina haga contacto con el filamento de actina. Los productos de la hidrólisis del ATP, a saber, ADP y P_i , permanecen enlazados al sitio activo de la enzima, en tanto que la proteína absorbe la energía liberada durante la hidrólisis (fig. 9-62, paso 2). Esta miosina energizada se fija entonces a la molécula de actina (paso 3), libera el fosfato enlazado y sufre un cambio de conformación controlado por la energía libre almacenada (fig. 9-62, paso 4). El cambio de conformación desplaza el filamento de actina hacia el centro de la sarcómera y por lo tanto representa el golpe de potencia de la cabeza de miosina. La liberación del ADP enlazado (paso 5) y la fijación de una nueva molécula de ATP a la cabeza de miosina (paso 1) induce la disociación del puente cruzado del filamento de actina para iniciar un nuevo ciclo. En ausencia de ATP, la cabeza de miosina permanece firmemente enlazada al filamento de actina. La incapacidad del puente transversal de miosina para separarse en ausencia de ATP es la base del estado *rigor mortis* que sobreviene después de la muerte.

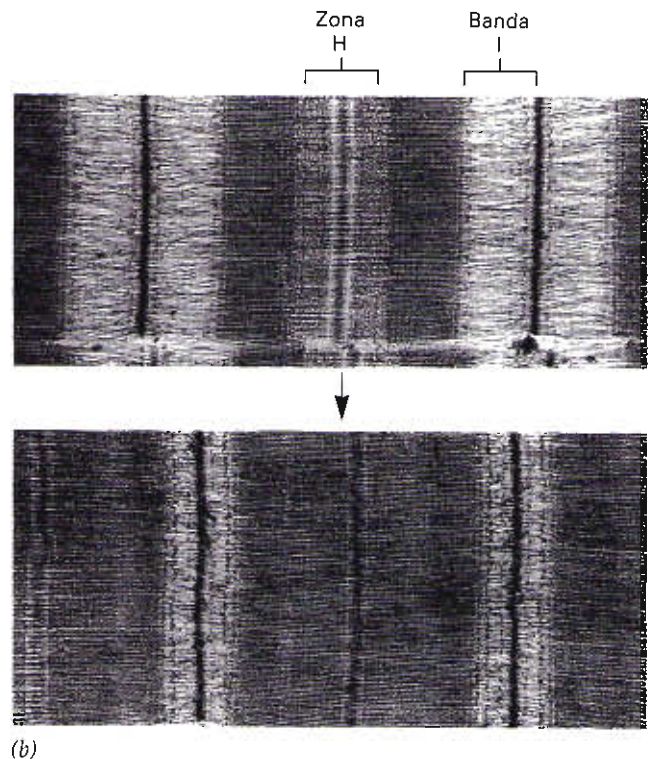
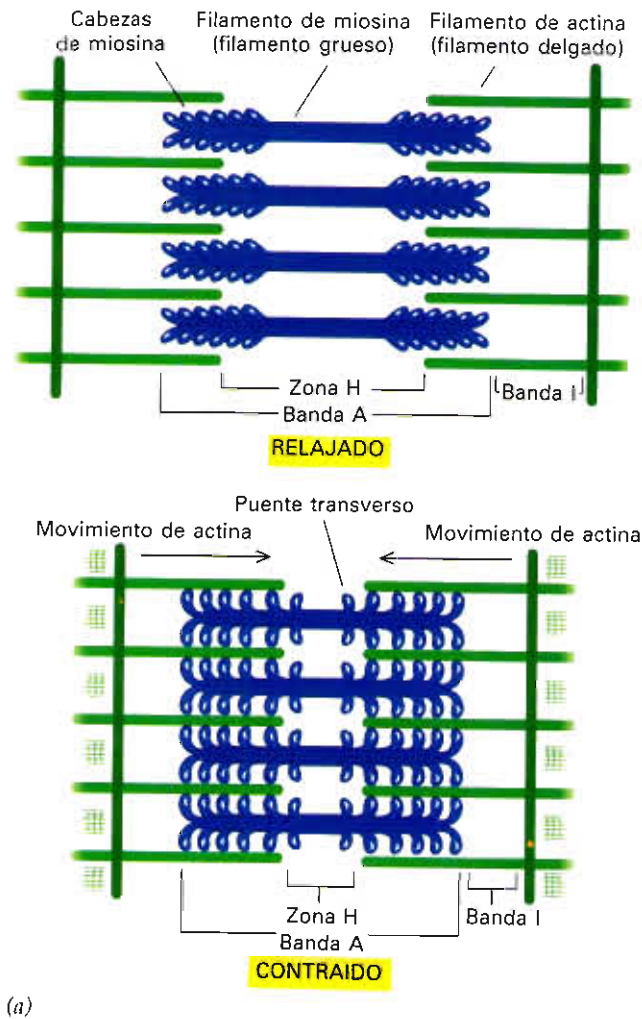


FIGURA 9-59. Acortamiento de la sarcómera durante la contracción muscular. a) Diagrama que muestra la diferencia en la estructura de la sarcómera en un músculo relajado y uno contraído. Durante la contracción, los puentes cruzados de miosina hacen contacto con los filamentos delgados que los rodean y los filamentos delgados se ven forzados a deslizarse hacia el centro de la sarcómera. b) Par de micrografías que muestran la desaparición de la banda I y de la zona H como resultado del deslizamiento de los filamentos delgados hacia el centro de la sarcómera. (b: Según James E. Dennis/PHOTOTAKE.)

Acoplamiento de excitación y contracción

Las fibras musculares se organizan en grupos denominados *unidades motoras*. Todas las fibras de una unidad motora están inervadas en conjunto por las ramas de una sola motoneurona y se contraen simultáneamente cuando llega un impulso excitatorio a lo largo del axón neuronal. El punto de contacto entre la porción terminal del axón y una fibra muscular se denomina **unión neuromuscular** (fig. 9-63; véase también la figura 4-49 para mayor detalle de la estructura de las sinapsis). La unión neuromuscular es el sitio de transmisión de los impulsos nerviosos procedentes del axón hacia la fibra muscular a través de la hendidura sináptica cuya membrana plasmática también es excitable y capaz de conducir un potencial de acción.

Los pasos que vinculan la llegada de un impulso nervioso a la membrana plasmática del músculo con el acortamiento de las sarcómeras profundas situadas dentro de la

fibra muscular constituyen un proceso conocido como **acoplamiento de excitación y contracción**. A diferencia de la neurona, donde un potencial de acción permanece en la superficie de la célula, el impulso generado en una célula muscular esquelética se propaga al interior de la célula a lo largo de pliegues membranosos llamados **túbulos transversos (T)** (fig. 9-63). Los túbulos T terminan en estrecha proximidad con el sistema de membranas citoplásmicas que constituyen el **retículo sarcoplásmico (RS)**, el cual forma un manguito membranoso alrededor de la miofibrilla. Casi 80% de las proteínas integrales de la membrana del RS consiste en Ca^{2+} -ATPasa cuya función es transportar iones Ca^{2+} fuera del citoplasma hacia el interior de la luz del RS, donde se almacenan hasta ser requeridos.

La importancia del calcio en la contracción muscular fue demostrada por primera vez en 1947 por L.V. Heilbrunn, de la Universidad de Pennsylvania, quien inyectó calcio a

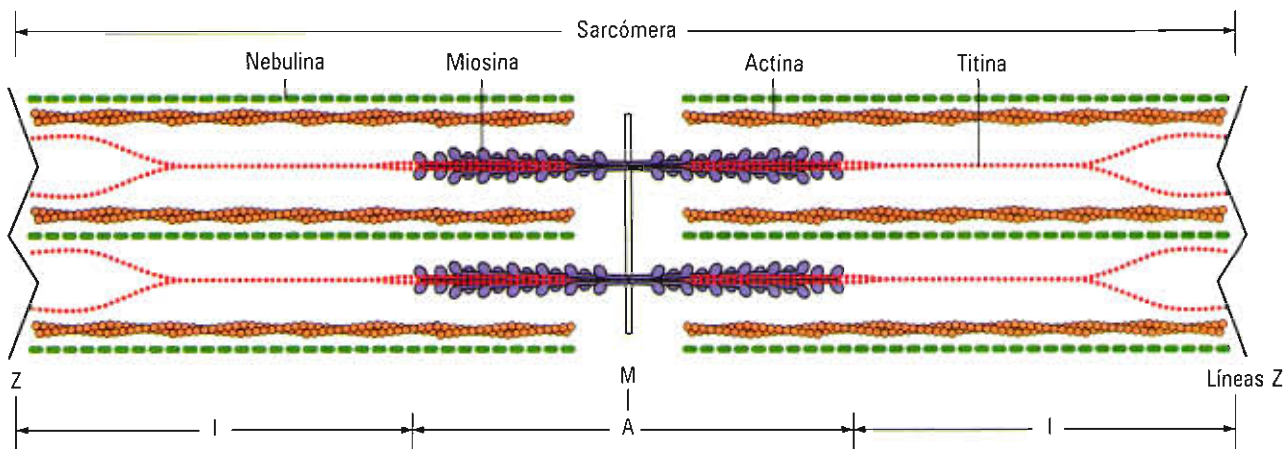


FIGURA 9-60. Disposición de las moléculas de titina dentro de la sarcómera. Estas moléculas bastante elásticas se estiran desde el extremo de la sarcómera en la línea Z hasta la banda M en el centro de la sarcómera. Tres a seis moléculas de titina se asocian a cada mitad de un filamento de miosina. Conforme la sarcómera se acorta, las moléculas elásticas de titina se estiran igualmente desde sitios opuestos. Se piensa que esto mantiene los filamentos gruesos en el centro de la sarcómera. Las moléculas de nebulina (que no se estudiaron en el texto) se relacionan con los filamentos delgados y se cree que regulan la longitud (es decir, el número de monómeros de actina) que constituyen cada filamento delgado. (Según T.C.S. Keller, Curr. Opin. Cell Biol. 7:33, 1995.)

una fibra muscular y observó contracción de la fibra. En estado relajado, la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma es muy baja (alrededor de 10^{-7} M), menos de la concentración umbral requerida para la contracción. Con la llegada de un potencial de acción a través de los túbulos transversos, los canales de calcio de la membrana del RS se abren y el calcio se difunde hacia afuera del compartimiento del RS a corta distancia de las miofibrillas. Como resultado, la concentración de Ca^{2+} se eleva desde 2×10^{-7} M hasta casi 5×10^{-5} M. Para entender cómo la elevación de la concentración de calcio desencadena la contracción de una fibra muscular esquelética es necesario reconsiderar la estructura de la proteína de los filamentos delgados.

En estado relajado, las moléculas de tropomiosina, localizadas en los surcos del filamento delgado (fig. 9-61), se sitúan en una posición que impide el acceso de moléculas de actina a las cabezas de miosina. La posición de la tropomiosina dentro del surco está bajo el control de la molécula de troponina fijada. Cuando la concentración de Ca^{2+} se eleva, los iones se fijan a una de las subunidades de troponina (troponina C), acontecimiento que provo-

ca un cambio de conformación en otra subunidad de la molécula de troponina, que a su vez se transmite a la tropomiosina adyacente, la cual se desplaza alrededor de 1.5 nm hacia el centro del surco del filamento (de la posición *b* a la *a* en la figura 9-64). Este cambio de posición de la tropomiosina expone el sitio de enlace de miosina sobre las moléculas adyacentes de actina, lo que permite que los puentes transversos situados sobre los filamentos gruesos se fijen a los filamentos delgados. Cada molécula de troponina controla la posición de una molécula de tropomiosina, que a su vez controla la capacidad de enlace de siete monómeros de actina unidos al filamento delgado.

Cuando se suspende la estimulación de la motoneurona inervante, se cierran los canales de Ca^{2+} en la membrana del RS y la Ca^{2+} -ATPasa elimina el exceso de calcio del citoplasma. Como resultado, los iones Ca^{2+} se separan de los sitios de enlace sobre la troponina, provocando que las moléculas de tropomiosina regresen a la posición donde impiden la interacción de actina y miosina. El proceso de relajación puede imaginarse como una lucha por el calcio entre la proteína de transporte de la membrana del RS y la troponina; la proteína de transporte tiene mayor afinidad por el ion, por lo que lo elimina preferencialmente del citoplasma y deja a la troponina en estado no enlazado.

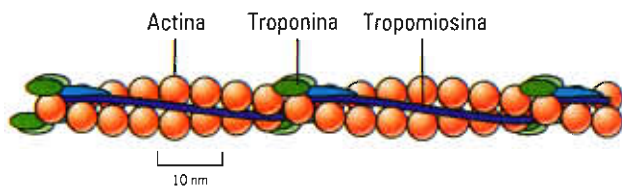


FIGURA 9-61. Organización molecular de los filamentos delgados. Cada filamento delgado consta de una disposición de subunidades de actina de doble hélice con una molécula de tropomiosina en forma de barra situada en los surcos y moléculas de troponina espaciadas a intervalos definidos, según se describe en el texto. Los cambios de conformación en estas proteínas que desencadenan la contracción se muestran en la figura 9-64.

9-7 Motilidad no muscular

Las células del músculo esquelético son un sistema ideal para estudiar contractilidad y movimiento,⁴ las proteínas

⁴ La contractilidad es resultado de las fuerzas de tracción generadas. En muchos casos, las interacciones contráctiles producen acortamiento, que es un tipo de movimiento, pero la contractilidad también puede ocurrir de manera isométrica en la cual se genera tensión sin acortamiento.

FIGURA 9-62. Ciclo contráctil de la actinmiosina. El movimiento de los filamentos delgados mediante una cabeza de miosina generadora de fuerza ocurre como resultado de la unión entre un ciclo mecánico que implica fijación, movimiento y separación de la cabeza, y un ciclo químico que implica enlace, hidrólisis y liberación de ATP, ADP y P_i . En este diagrama, los dos ciclos se inician en el paso 1 con el enlace de ATP a una hendidura en la cabeza de miosina, lo que provoca la separación de la cabeza del filamento de actina. La hidrólisis del ATP enlazado (paso 2) energiza la cabeza y provoca que se enlace débilmente al filamento de actina (paso 3). La liberación de P_i causa fijación más firme de la cabeza de miosina al filamento delgado y el golpe de potencia (paso 4) que mueve el filamento delgado hacia el centro de la sarcómera. La liberación del ADP (paso 5) prepara el mecanismo para otro ciclo. (Según M.Y. Jiang y M.P. Sheetz, *Bioess.* 16:532, 1994.)

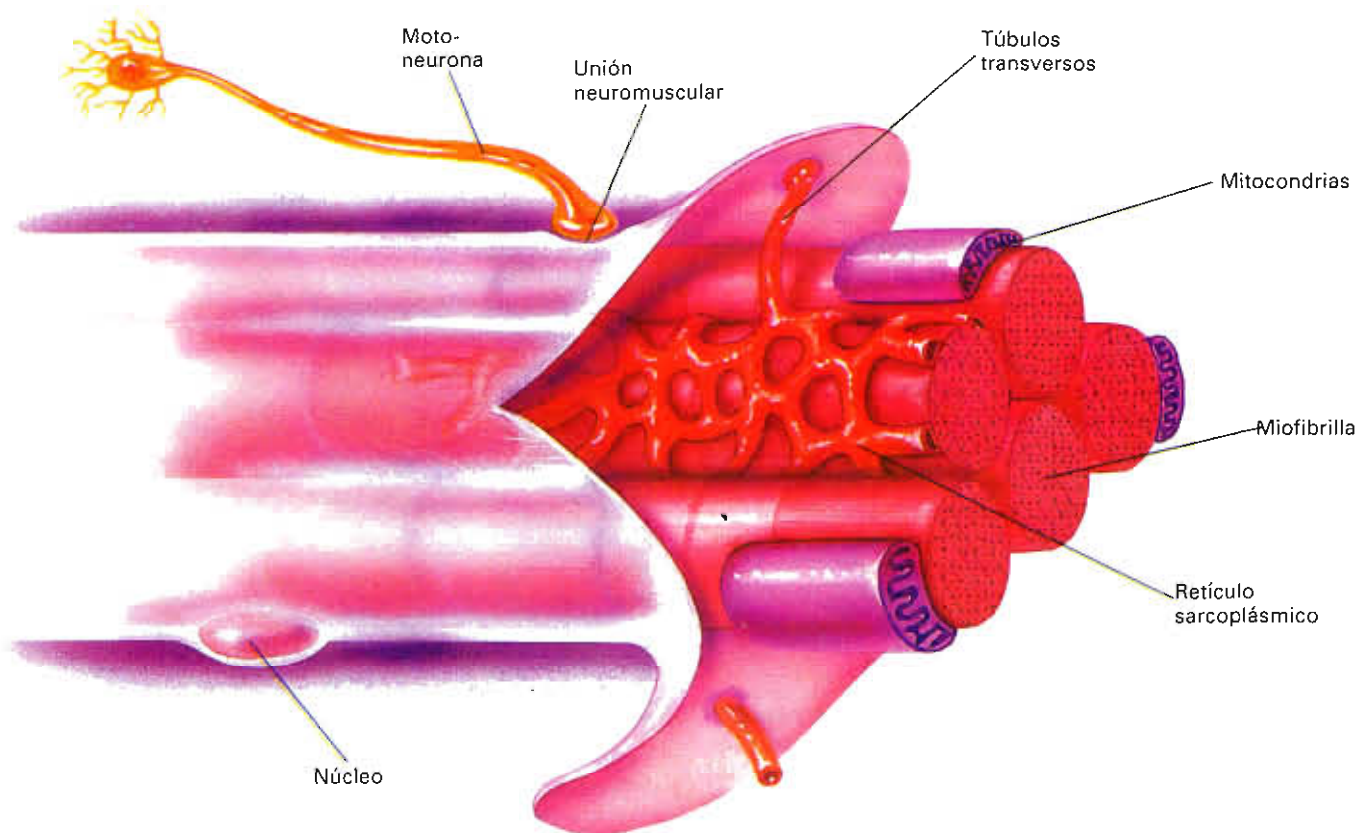
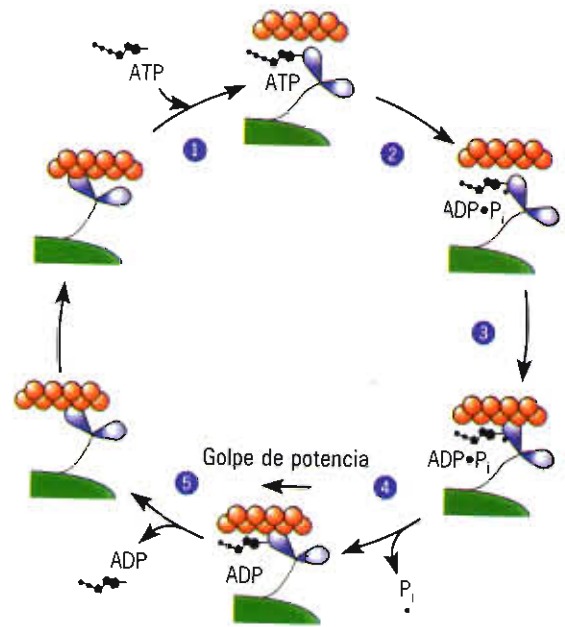


FIGURA 9-63. Anatomía funcional de una fibra muscular. El calcio se aloja en la red elaborada de membranas internas que constituyen el retículo sarcoplásmico (RS). Cuando un impulso llega a través de una motoneurona, se transporta al interior de la fibra a lo largo de la membrana del túbulo transverso hacia el retículo sarcoplásmico. La compuerta de calcio del RS se abre y libera calcio en el citoplasma. El enlace de iones calcio a las moléculas de troponina de los filamentos delgados produce los acontecimientos descritos en la siguiente figura y la contracción de la fibra.

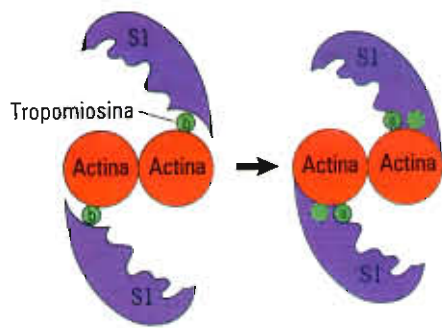


FIGURA 9-64. Papel de la tropomiosina en la contracción muscular. Diagrama del modelo de impedimento estérico en el cual el sitio de unión de la miosina sobre los filamentos delgados de actina está controlado por la posición de la molécula de tropomiosina. Cuando la concentración de calcio se eleva, la integración entre calcio y troponina (no mostrada) provoca un movimiento de la tropomiosina desplazándola de la posición *b* a la posición *a*, que expone el sitio de enlace sobre el filamento delgado de la cabeza de miosina.

contráctiles que interactúan están presentes en concentración elevada y forman parte de estructuras celulares definidas. El estudio de la motilidad no muscular es más desafiante debido a que los componentes importantes tienden a ocurrir en disposiciones transitorias más lábiles y menos ordenadas, y en condiciones típicas se restringen a una delgada *zona cortical* justo por debajo de la membrana plasmática. Esta zona cortical es una región activa de la célula encargada de procesos como ingestión de materiales extracelulares, extensión de prolongaciones durante el movimiento celular y constricción de una célula para formar dos células durante la división celular. Todos estos procesos dependen del ensamblado de microfilamentos en la corteza.

Aunque las “reglas básicas” de la contractilidad muscular y no muscular pueden ser muy diferentes, en todo tipo de células los procesos de movimiento se originan en las mismas dos proteínas: actina y miosina. En las siguientes páginas consideraremos algunos ejemplos de contractilidad y motilidad no muscular que dependen de filamentos de actina y de proteínas motoras similares a miosina. Sin embargo, es importante examinar primero los factores que gobiernan la tasa de ensamblado, número, longitud y patrones espaciales de los filamentos de actina.

Proteínas enlazadas a actina

La actina purificada puede polimerizarse *in vitro* para formar filamentos de actina, pero dichos filamentos carecen de capacidad para interactuar entre sí o efectuar actividades útiles. Cuando se observan al microscopio recuerdan el piso de un establo cubierto de paja. En contraste, los filamentos de actina de células vivas se organizan en varios patrones que incluyen haces de diferente tipo, redes delgadas (biuimentales) y un complejo gel tridimensional (fig. 9-65). No hay verdadera diferencia entre los propios filamentos de actina. Más bien, la organización y conducta de los fila-

mentos de actina dentro de las células es determinada por una notable variedad de **proteínas enlazadas a la actina** que afectan el ensamblado, propiedades físicas e interacciones entre sí y con otros organelos celulares. De los filamentos de actina se han aislado casi 100 diferentes proteínas enlazadas a actina pertenecientes a muchas familias de uno u otro tipo de célula. El tema es complejo y todavía no bien comprendido.

Las proteínas enlazadas a actina se pueden dividir en varias categorías según sus presuntas funciones en la célula (cuadro 9-3 y figura 9-66). Es digno de notar que algunas de estas proteínas pueden efectuar más de una actividad según su concentración, estado de la proteína (por ejemplo, si está fosforilada o no) y las condiciones prevaletientes (p. ej., concentración de iones Ca^{2+} y H^+). Además, un filamento de actina contiene gran número de monómeros de actina y por lo tanto permite a las diferentes proteínas enlazadas actuar simultáneamente en diferentes sitios a lo largo del filamento.

1. **Proteínas que secuestran monómeros.** La primera proteína enlazada a actina que se descubrió se denominó *profilina*; se demostró que se enlaza a monómeros de actina G y evita su polimerización. Se cree que la presencia de proteínas que secuestran actina explica la concentración



FIGURA 9-65. Organización de los filamentos de actina dentro de la célula. Como se describe al final de este capítulo, las células se mueven a través de un sustrato extendiendo varios tipos de prolongaciones. La micrografía electrónica muestra el borde delantero de un fibroblasto móvil que muestra los filamentos de actina de alta densidad. Se observa que estos filamentos están organizados en dos formas distintas: como haces en los cuales los filamentos se disponen paralelos entre sí (flecha) y como una red de enlaces transversos en la cual los filamentos se disponen en varias direcciones. (Cortesía de J. Victor Small.)

CUADRO 9-3. Proteínas enlazadas a actina

Proteínas	Peso molecular (kD)	Fuente
Proteínas que secuestran monómeros		
Profilina	12-15	Ampliamente propagada
Timosinas	5	Ampliamente propagada
Depactina	18	Oocitos de la estrella de mar
Destrina	19	Riñón
Proteínas que bloquean extremos		
β -actinina	35-37	Riñón, músculo esquelético
Casquete Z	32, 34	Músculo
Proteína de recubrimiento	28-31	<i>Acanthamoeba</i>
Proteínas de enlaces transversos		
Filamina	250	Músculo liso
Proteína enlazada a actina (PEA)	250	Plaquetas, macrófagos
Gelactina	23-28	Amibas
Proteínas en haces		
Fimbrina	68	Epitelio intestinal, etc.
Vellina	95	Epitelio intestinal, oocitos
Fascina	57	Huevos de erizo de mar
α -Actinina	95	Músculo
Proteínas que cortan filamentos		
Gelsolina	90	Células de mamífero
Fragmina/severina	42	Amibas, huevos erizo de mar
Brevina	93	Plasma sanguíneo
Proteínas enlazadas a membrana		
Distrofina	427	Músculo esquelético
Vinculina	130	Ampliamente propagada
Ponticulina	17	<i>Dictyostelium</i>

NOTA: Muchas de las proteínas que se enlazan a actina pueden tener más de una función, dependiendo de las condiciones.

relativamente alta de actina G en células no musculares (50 a 200 μm); si estuvieran ausentes, las condiciones en el citoplasma favorecerían la polimerización casi completa de la actina soluble G. Debido a su capacidad para unirse a la actina G y estabilizar la reserva de monómeros, los cambios en la concentración o actividad de proteínas que secuestran actina pueden variar el equilibrio monómero-polímero en cierta región de la célula y provocar que en ese momento se favorezca la polimerización o la despolimerización. Se cree que las proteínas más importantes que secuestran monómeros son miembros de la familia *timosina* (p. ej., T β ₄), pequeñas proteínas presentes en concentración elevada en células no musculares que se enlazan con alta afinidad a la actina G. Las timosinas también reciben este nombre porque originalmente se aislaron de los tejidos del timo, donde se cree actúan como hormonas tímicas.

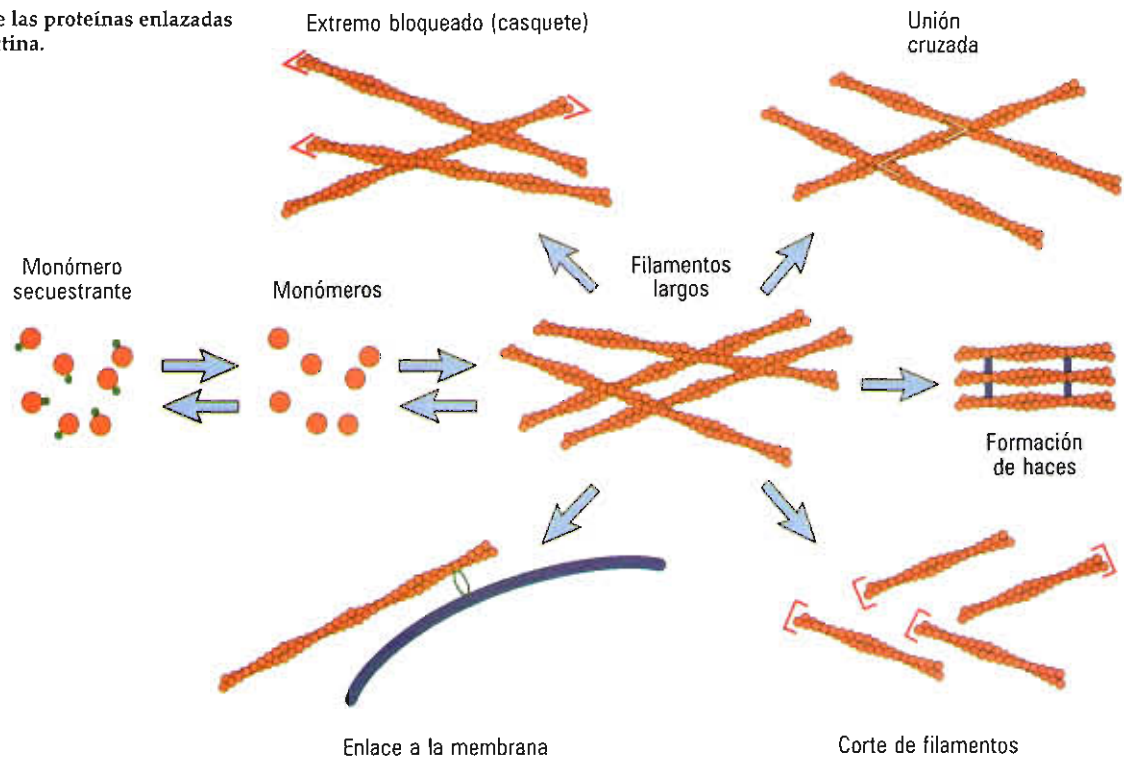
2. **Proteínas que bloquean extremos (casquetes).** Las proteínas de este grupo pueden regular la longitud de los

filamentos de actina al enlazarse a uno u otro extremo del filamento, y por lo tanto al formar un casquete. Si se cubre el extremo de crecimiento rápido (más) del filamento, puede ocurrir despolimerización en el extremo opuesto y como resultado el filamento se desensambla. Ciertas proteínas bloqueadoras de extremos pueden promover la formación de nuevos filamentos (*nucleación*) y al mismo tiempo inhibir el alargamiento de los filamentos existentes. En conjunto, el resultado es la presencia de mayor número de filamentos más pequeños. Las proteínas bloqueadoras de extremos incluyen el casquete Z y la β -actinina.

3. **Proteínas de enlace transversal.** En este grupo se incluye una gran variedad de proteínas capaces de alterar la organización tridimensional de una población de filamentos de actina. Cada proteína tiene dos o más sitios de enlace para actina y por lo tanto puede enlazar transversalmente dos o más filamentos de actina separados. Algunas de estas proteínas tienen forma de varilla flexible larga y tienden a promover la formación de redes laxas de filamentos interconectados en ángulo casi recto (como en la figura 9-65). Las regiones del citoplasma que contienen estas redes muestran propiedades de gel elástico capaz de resistir presión mecánica local. Las proteínas que favorecen la formación de gel tridimensional incluyen ABP280 y filamina. Otras proteínas de enlace transversal tienen forma globular y promueven la formación de haces filamentosos de actina en disposiciones paralelas de mallas apretadas. Las microvellosidades que se prolongan desde la superficie apical de las células del epitelio intestinal y de las células que revisten los túbulos renales contienen haces de microfilamentos alineados paralelos al eje longitudinal de las microvellosidades (fig. 9-67). Los microfilamentos se mantienen en haces por las proteínas vellina y fimbrina enlazadas a la actina. También se encuentran haces de filamentos de actina en los *estereocilios* filiformes (fig. 9-68) que se prolongan desde las células receptoras del oído interno, donde desempeñan un papel clave en el sentido de la audición y el equilibrio. Los filamentos reunidos en haces adquieren mayor rigidez, lo que les permite actuar como un esqueleto interno de apoyo para esas prolongaciones citoplásmicas.

4. **Proteínas que cortan filamentos.** Las proteínas de este tipo tienen capacidad para enlazarse a un filamento ya existente y partirlo en dos. Reducen la longitud de los filamentos y disminuyen con rapidez la viscosidad del citoplasma. La primera proteína de este tipo que se identificó fue la gelsolina, descubierta gracias a su capacidad para licuar (solubilizar) extractos citoplásmicos gelados. Al crear extremos libres adicionales, las proteínas cortadoras también pueden promover el ensamblado de monómeros de actina G o recubrir con un casquete los fragmentos que generan. Severina y fragmina son otras proteínas que cortan filamentos de actina.

5. **Proteínas enlazadas a la membrana.** Gran parte del mecanismo contráctil de células no musculares se sitúa justo por debajo de la membrana plasmática. Durante numerosas actividades, las fuerzas generadas por la proteína contráctil actúan sobre la membrana plasmática empujándola hacia afuera (como ocurre, por ejemplo, durante la locomoción celular) o causando su invaginación hacia adentro (por ejemplo, durante la fagocitosis o la citocinesis). Estas

FIGURA 9-66. Papel de las proteínas enlazadas a actina.

actividades son facilitadas por el enlace de filamentos de actina a la membrana plasmática, ya sea directamente por medio de fijación a los dominios citoplásmicos de una proteína integral de membrana o indirectamente por fijación a una proteína periférica de la membrana. En capítulos previos se describieron dos ejemplos de este último tipo: la inclusión de polímeros cortos de actina como parte del esqueleto de la membrana de los eritrocitos (fig. 4-31) y la fijación de filamentos de actina a la membrana en contactos focales y uniones adherentes (figs. 7-17, *b*, y 7-26, *a*). Las proteínas que unen la membrana con actina incluyen espectrina, vinculina y miembros de la familia ERM (ezrina, radixina y moesina). Uno de los miembros más difundidos de la familia de las espectrinas es la proteína distrofina, una proteína enlazada a actina sobre la superficie interna de la membrana plasmática (fig. 9-69). Se cree que la distrofina tiene un papel estructural en la unión del mecanismo contráctil de las células musculares con la membrana plasmática suprayacente. Las mutaciones del gen que codifica la distrofina causan distrofia muscular, enfermedad hereditaria caracterizada por debilidad y disfunción muscular progresiva. Se piensa que el daño muscular se debe a desgarro de la membrana plasmática y su complejo citoesquelético relacionado causado por las contracciones musculares.

Ejemplos de contractilidad y motilidad no muscular

Los filamentos de actina y los motores de miosina se encargan de gran variedad de actividades dinámicas en células

no musculares, incluyendo citocinesis, fagocitosis, corrientes citoplásmicas (flujo orientado de la masa citoplásmica que ocurre en ciertas células vegetales grandes), tráfico de vesículas, activación de plaquetas sanguíneas, movimientos laterales de proteínas integrales dentro de la membrana plasmática, interacción de sustratos celulares, locomoción celular, crecimiento axonal y cambios en la morfología celular. La motilidad y contractilidad no muscular se ilustran en los siguientes ejemplos.

Interacciones célula-sustrato y papel de las fibras de esfuerzo

Cuando se permite a una célula asentarse en el fondo de un plato de cultivo, se aplanan y extienden sobre el sustrato. Esta fijación con frecuencia implica la formación de contactos focales adherentes firmes (descritos en la página 251). Justo por debajo de la membrana plasmática del contacto focal se observan filamentos de actina alineados en haces estrechamente apretados llamados **fibras de esfuerzo** (fig. 9-70, *a, b*). Las fibras de esfuerzo son muy parecidas a las miofibrillas del tejido del músculo esquelético, más que cualquier otra estructura en una célula no muscular. Además de actina, las fibras de esfuerzo contienen algunas otras proteínas típicas de células musculares, incluyendo miosina, tropomiosina y α -actinina. Este último grupo de proteínas se presenta de manera discontinua a lo largo de la fibra de esfuerzo, confiriéndole un aspecto bandeado (fig. 9-70, *b*) que recuerda las sarcómeros de una fibra de músculo esquelético. En contraste, los filamentos de actina corren como elementos continuos a través de las fibras de esfuerzo, pero la tinción con meromiosina pesada indica que los filamentos de actina

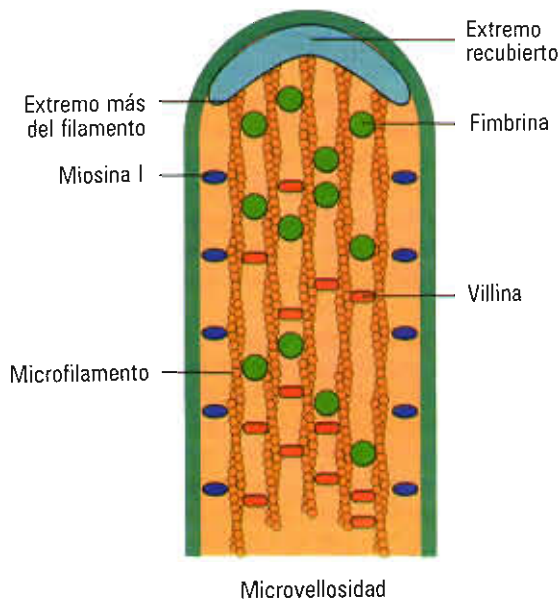


FIGURA 9-67. Filamentos de actina y proteínas enlazadas a actina en una microvellosidad. Las microvellosidades se encuentran en la superficie apical de los epitelios que sirve para absorber solutos, como en el revestimiento del intestino y la pared del túbulo renal. Cada microvellosidad contiene cerca de 25 filamentos de actina mantenidos en disposición altamente ordenada por las proteínas villina y fimbrina formadoras de haces. Todavía no está claro el papel de la miosina I, que se presenta entre las membranas plasmáticas de las microvellosidades y los filamentos periféricos de actina.

dentro de un haz determinado se orientan en ambas direcciones.

Dado este tipo de organización antiparalela, se podría esperar que una fibra de esfuerzo sea una estructura con-

tráctil. Esta expectativa se origina en estudios de fibras de esfuerzo aisladas de células mediante microcirugía con rayo laser; las fibras de esfuerzo aisladas se contraen en presencia de ATP. Este dato plantea una pregunta interesante: ¿por qué debe haber fibras potencialmente contráctiles en células adherentes que no participan en ningún tipo de actividad locomotora? En realidad, cuando se aplica un estímulo para mover una célula cultivada sedentaria, con frecuencia uno de los primeros cambios visibles es la pérdida de las fibras de esfuerzo. Se cree que las fibras de esfuerzo de una célula firmemente adherida sufren contracción *isométrica*, o sea, contracción que genera tensión sin cambio de longitud. Este tipo de contracción ayuda a mantener la tensión entre la célula y el sustrato. En el cuerpo pueden observarse fibras de esfuerzo en células de la superficie extracelular expuestas a fuerzas deslizantes que tienden a separarlas de su sustrato.

Locomoción celular

La locomoción celular, como ocurre en un organismo multicelular, de ordinario es imposible de observar, ya que tiene lugar en tejidos opacos y células indistinguibles de otras células que las rodean. Por consiguiente, la mayoría de los investigadores estudian la locomoción celular en sistemas donde se pueden observar células únicas conforme se desplazan sobre el fondo del plato de cultivo, según se muestra en la figura 9-71.

La locomoción celular comparte propiedades con otros tipos de locomoción, como la marcha. Si una persona camina, su cuerpo efectúa una serie de actividades repetitivas. Primero extiende una pierna en la dirección del desplazamiento; segundo, el extremo inferior del pie hace contacto con el piso, que actúa como punto de adherencia transitoria; tercero, los músculos de la pierna generan una fuerza que impulsa el cuerpo (incluyendo la otra pierna) hacia

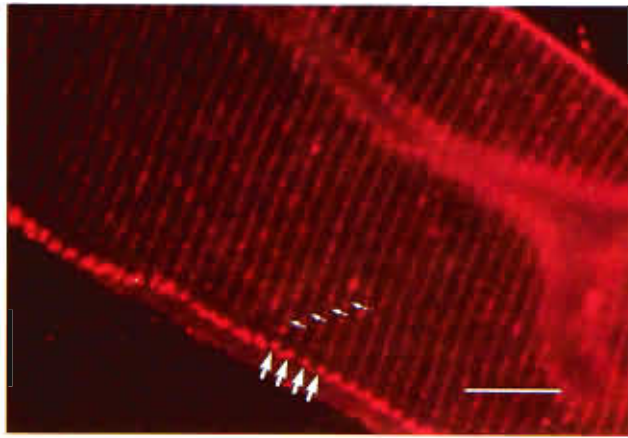


(a)

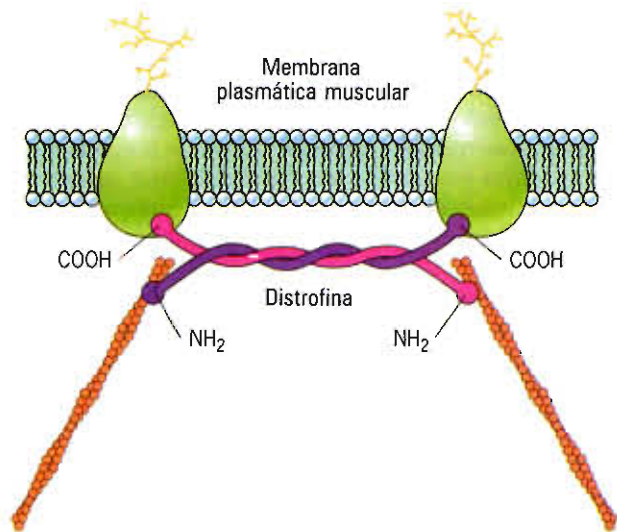
FIGURA 9-68. Estereocilios que se proyectan desde la superficie de una célula pilosa. Las células pilosas, como las que se observan en el oído interno humano, son sensibles a la estimulación mecánica que provoca el desplazamiento de los estereocilios que se proyectan desde la célula. a) Gammagrafía electrónica de un haz de estereocilios tomados del oído interno de una rana toro. b) Micrografía electrónica de transmisión de una sección transversal de un estereocilio mostrando que está compuesto de un haz denso de filamentos de actina. (a: Cortesía de A.J. Hudspeth y R.A. Jacobs; b: cortesía de A.J. Hudspeth, R.A. Jacobs y P.G. Gillespie.)



(b)



(a)



(b)

FIGURA 9-69. Distrofina, una proteína que une filamentos de actina a la membrana plasmática de las células musculares. *a)* Micrografía de fluorescencia de una porción de una célula muscular esquelética de ratón marcada con anticuerpos contra distrofina. La localización de la distrofina en la superficie interna de la membrana plasmática se muestra por las áreas de mayor tamaño y color rojizo (flechas grandes). La distrofina se localiza donde las líneas Z en los extremos de las sarcómeros entran en contacto con la membrana. Las líneas Z están débilmente marcadas debido a que los anticuerpos antidistrofina muestran débil capacidad para enlazarse a una proteína relacionada, α -actinina, que está concentrada en las líneas Z (flechas pequeñas). Barra, 10 μ m. *b)* Diagrama de la forma en la cual la distrofina junta proteínas integrales de membrana y filamentos de actina. (*a)* Según Volker Straub, Reginald E. Bittner, Jean J. Leger y Thomas Voit, *J. Cell Biol.* 119:1186, 1992; con permiso de Rockefeller University Press.)

adelante, todo esto mientras se genera tracción contra el punto de adherencia; cuarto, el pie, que ahora se encuentra detrás del cuerpo y no al frente del mismo, se levanta del piso antes del siguiente paso. Aunque las células movibles pueden adoptar formas muy diferentes conforme se arras-

tran sobre el sustrato, muestran una secuencia similar repetitiva de actividades (fig. 9-72): 1) el movimiento se inicia por protrusión de una parte de la superficie celular en la dirección del desplazamiento de la célula; 2) una parte de la superficie interna de la célula se fija al sustrato formando un sitio de adherencia; 3) la masa celular se desliza hacia adelante sobre el contacto adherente, que finalmente entra a formar parte de la porción trasera de la célula, y 4) la célula se aparta bruscamente de su contacto posterior con la superficie, provocando retracción del borde trasero o "cola".

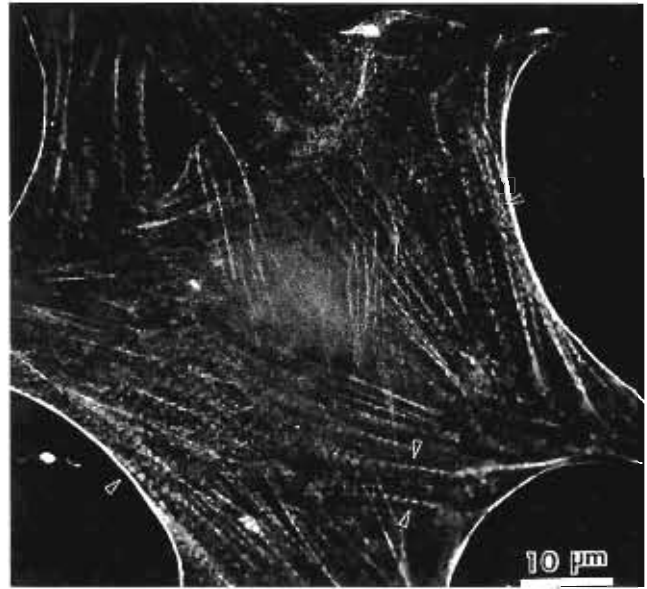
Células que se arrastran sobre el sustrato. Quienquiera que observe a una ameba arrastrándose sobre la superficie de un portaobjetos tiene la oportunidad de ver uno de los tipos más espectaculares de locomoción celular. Conforme el microorganismo se desplaza, se observan partes de la superficie celular empujadas hacia adelante por una columna de citoplasma que fluye del interior de la célula hacia la periferia (fig. 9-73). Las partes salientes redondeadas y anchas que se forman durante los movimientos ameboides se denominan **seudópodos**. A medida que el citoplasma fluye al interior del pseudópodo que avanza, la ameba se mueve lentamente en una u otra dirección.

La locomoción de células únicas en organismos evolutivamente elevados de ordinario no se efectúa mediante flujo citoplásmico obvio, sino que se acompaña de diferentes tipos de prolongaciones de la superficie celular sobre el borde delantero de la célula. Un fibroblasto de mamífero que se desplaza sobre la superficie de un plato de cultivo puede ser un ejemplo de locomoción muy diferente de la amebiana. Conforme el fibroblasto avanza se aplanan sobre el sustrato y por lo general adopta la forma de un abanico con un extremo frontal ancho y una "cola" estrecha (fig. 9-71). Su movimiento es errático y por saltos, unas veces avanza y otras retrocede. En condiciones adecuadas, un fibroblasto puede moverse una distancia aproximada de 1 mm. La clave de la habilidad del fibroblasto para la locomoción reside en la orilla delantera, que se extiende fuera de la célula como una prolongación ancha y aplanada en forma de velo, llamada **lamelipodio**, la cual se desliza hacia adelante sobre el sustrato (fig. 9-74, *a*). Los lamelipodios típicamente están desprovistos de una estructura particular y su borde externo con frecuencia muestra movimientos ondulatorios que le dan aspecto rugoso (fig. 9-74, *b*). Conforme el lamelipodio se extiende desde la célula, se adhiere al sustrato subyacente en puntos específicos suministrando sitios transitorios de fijación sobre los cuales se arrastra la célula.

La protrusión de un lamelipodio se acompaña del ensamblado de monómeros de actina en filamentos y la organización de estos filamentos en arreglos organizados mediante uniones a proteínas enlazadas a actina. En la figura 9-75, *a*, se muestra la elevada concentración de filamentos de actina en el borde delantero de una célula que se desplaza en comparación con el resto del citoplasma. La organización tridimensional de los microfilamentos del borde delantero se aprecia mejor luego de extraer las células con detergentes no iónicos (fig. 9-75, *b*). Los microfilamentos del lamelipodio suministran una parte esencial del mecanismo necesario para la locomoción. El tratamiento de una célula con citocalasina provoca la rápida desapa-



(a)



(b)

FIGURA 9-70. Fibras de esfuerzo. *a)* Distribución de las fibras de esfuerzo en un fibroblasto cultivado según lo revelan anticuerpos antiactina fluorescente. *b)* Disposición periódica de la tropomiosina dentro de las fibras de esfuerzo de una célula cultivada extendida según lo revela el tratamiento con anticuerpos antitropomiosina. (*a*: Según Elias Lazarides, *J. Cell Biol.* 65:553, 1975; con permiso de Rockefeller University Press; *b*: según J.R. Feramisco y cols. *Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation*, vol. 8, 1983.)

rición de la red de filamentos del lamelipodio y el cese del movimiento.

Los lamelipodios también contienen numerosas proteínas de unión cruzada, cortadoras y formadoras de haces de

actina (pág. 369). La importancia de las proteínas accesorias de la actina se aprecia en estudios de células del melanoma humano que no pueden expresar la proteína ABP de unión cruzada. Estas células son incapaces de extender lamelipodios normales, pero en vez de ello muestran muchas



15 µm

FIGURA 9-71. Gammaografía electrónica de un fibroblasto de ratón "arrastrándose" sobre la superficie de un plato de cultivo. El borde delantero de la célula se extiende mediante un lamelipodio aplanado cuya estructura y función se analizan después en este capítulo. (Según Guenter Albrecht-Buehler, *Int. Rev. Cytol.* 120:194, 1990.)

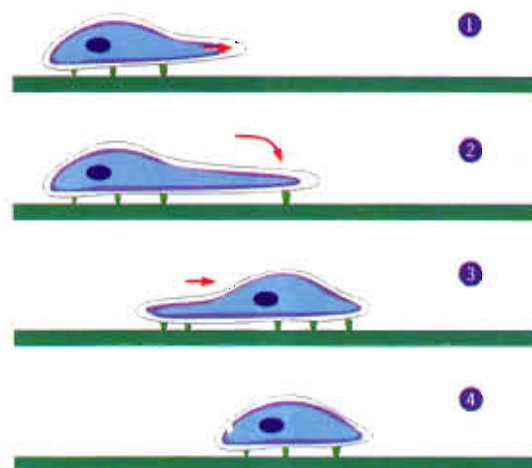


FIGURA 9-72. Secuencia de actividades repetitivas que ocurren conforme una célula se arrastra sobre el sustrato.

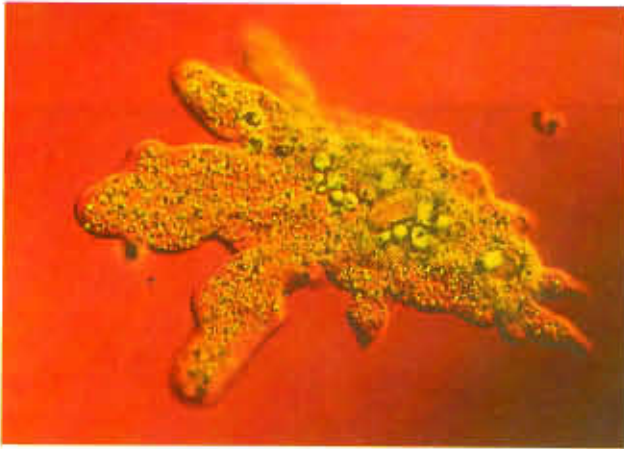
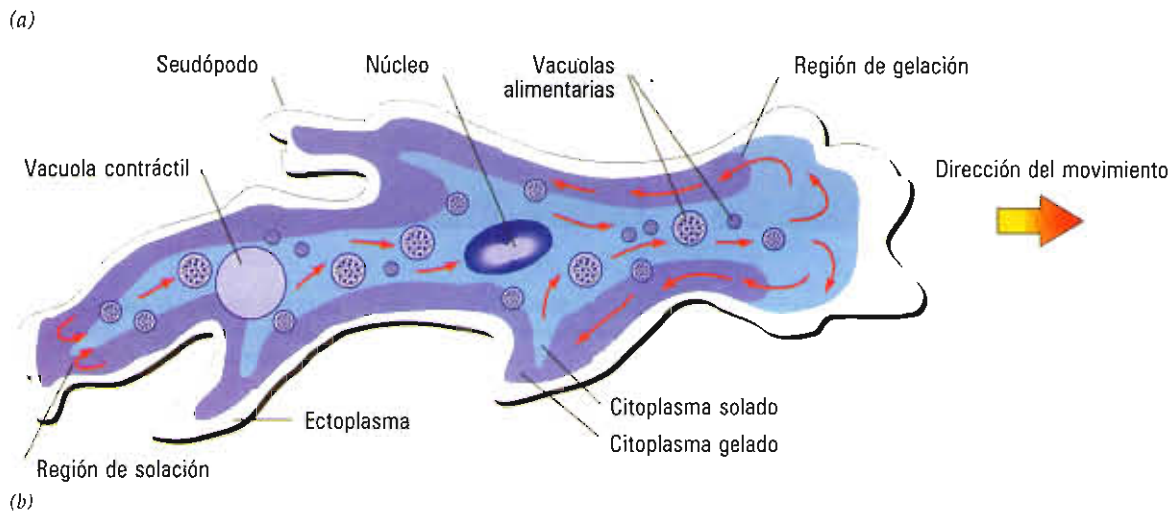
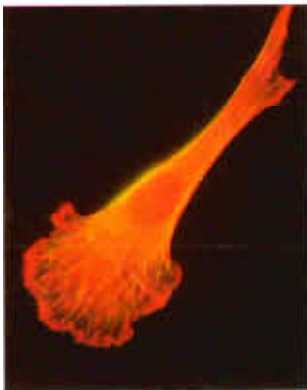


FIGURA 9-73. Movimiento ameboide. *a)* Micrografía de una ameba viviente que se mueve sobre un sustrato. *b)* Conforme la ameba se desplaza, una columna de endoplasma en estado de solución (líquido) fluye a través de la región central de la célula hacia el extremo frontal, donde fluye lateralmente y se convierte a un estado más gelificado. Se cree que la gelificación del flujo de citoplasma, que resulta de enlaces transversos de los filamentos de actina que forman una red, es el factor que genera la fuerza necesaria para el movimiento de la célula. El citoplasma gelificado de la región periférica de la célula se convierte de nuevo a estado de solución en la región de la cola. (*a:* Según M. Abbey/Visuals Unlimited.)



burbujas localizadas alrededor de su circunferencia (fig. 9-76). La introducción de un gen por la proteína de unión cruzada perdida en estas células restablece su capacidad para formar prolongaciones normales en la superficie y participar en la locomoción dirigida.

En la figura 9-77 se muestran dos mecanismos alternos para generar las fuerzas necesarias para formar prolongaciones celulares en el borde delantero de una célula móvil. Ambos mecanismos tal vez contribuyan al proceso total de la locomoción celular. Una hipótesis sugiere que, igual



(a)



(b)

FIGURA 9-74. Borde delantero de una célula móvil. *a)* El borde delantero de este fibroblasto móvil se aplana contra el sustrato y se extiende en un lamelipodio en forma de velo. *b)* Gammagrafía electrónica del borde delantero de una célula cultivada que muestra la membrana rugosa del lamelipodio. (*a:* Cortesía de Victor Small; *b:* según Jean Paul Revel, Symp. Soc. Exp. Biol. 28:447, 1974.)

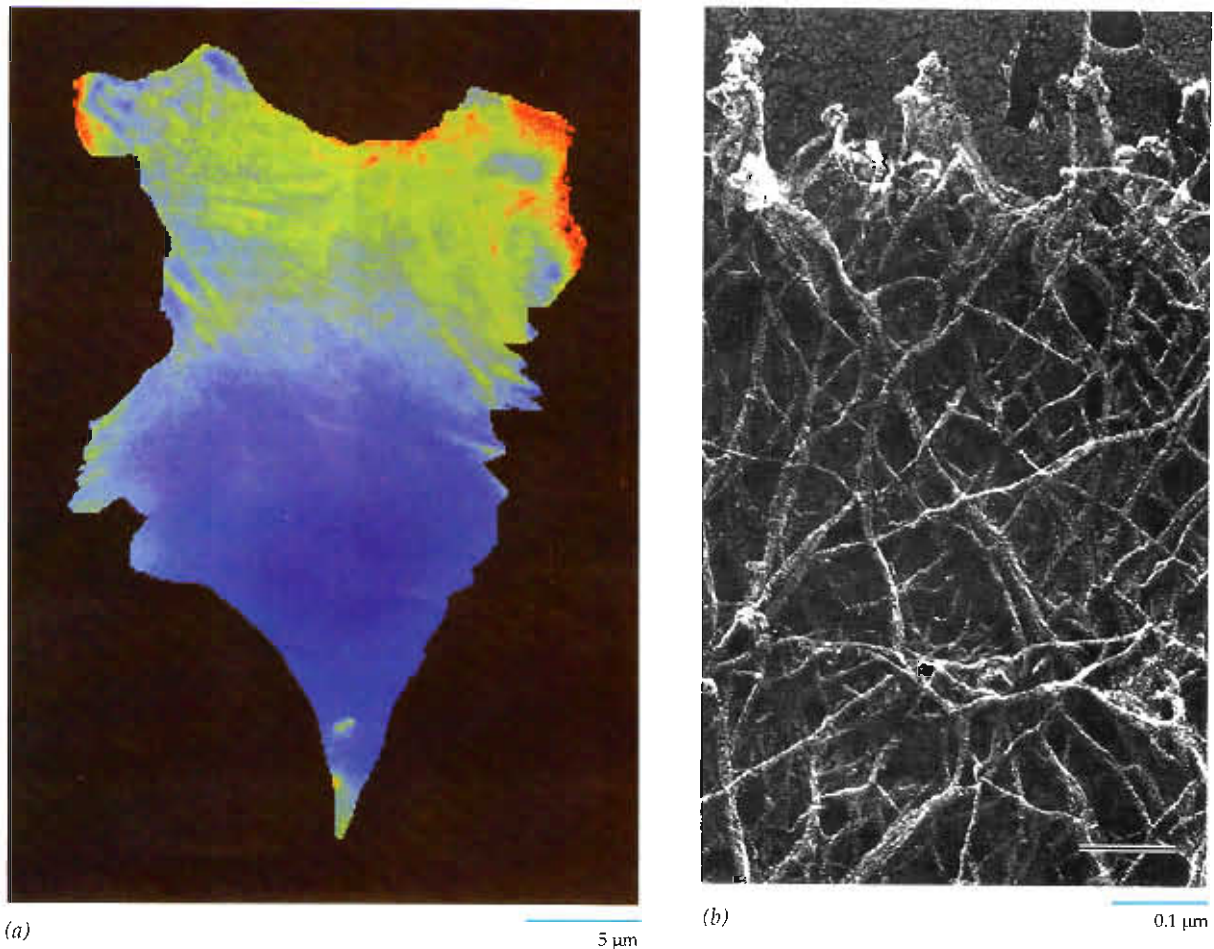


FIGURA 9-75. Filamentos de actina concentrados en el borde delantero de la célula móvil. *a)* La distribución de los filamentos de actina dentro del citoplasma de un fibroblasto en locomoción está indicada por los patrones de color. El color rojizo en el borde delantero de la célula indica un filamento de actina con densidad aproximadamente 10 veces mayor que la de color azul más profundo presente en la masa de la célula, y un incremento al doble de la densidad del filamento de actina sobre las áreas amarillo-verdes detrás del borde delantero. El patrón de color se basa en cálculos de la densidad del filamento de actina que llega por microinyección de análogos fluorescentes de actina que tienen diferentes propiedades para ensamblarse en filamentos. *b)* Micrografía electrónica del borde delantero de un lamelipodio del cono de crecimiento de una neurona fijada, extraída con detergente, congelada rápidamente y tratada al agua fuerte. Esta porción de la célula se observa llena con filamentos de actina que permanecen insolubles después de la extracción con detergente no iónico. La orientación general de los filamentos de actina más largos es perpendicular al borde delantero. Barra, 0.1 μm . (*a*: Según Kenneth A. Giuliano y D. Lansing Taylor, J. Cell Biol. 124:978, 1994; *b*: según Annette K. Lewis y Paul C. Bridgman, J. Cell Biol. 119:1235, 1992; ambas con permiso de Rockefeller University Press.)

que la formación del filamento acrosómico (pág. 360), la membrana plasmática sobresale al exterior como resultado de la unión de subunidades de actina en los extremos de los microfilamentos corticales. Una posibilidad alterna es que la protrusión de la membrana sea consecuencia de fuerzas generadas por interacción entre moléculas de miosina y los microfilamentos corticales. Cuando se impide la acción de la miosina inyectando anticuerpos anti miosina, se afecta de manera adversa la locomoción celular. Estudios con anticuerpos fluorescentes contra diferentes tipos de miosinas indican que la miosina I se localiza de preferencia en el extremo frontal de una célula en movimiento, en tanto que la miosina II se concentra hacia el extremo posterior de la célula (fig. 9-78). Como se mencionó anteriormente, las células del moho del fango *Dictyostelium*, que carecen totalmen-

te de miosina II, pueden efectuar locomoción relativamente normal, lo que sugiere que la miosina I puede ser el motor primario para impulsar la locomoción celular. Desde hace muchos años se sabe que la miosina está presente en regiones móviles de células no musculares, pero sólo recientemente se observaron filamentos bipolares de miosina pequeña en estas regiones. El mecanismo de la miosina para generar las fuerzas encargadas de la locomoción todavía es especulativo.

El estudio de una célula que se desplaza a través de un sustrato está lleno de contradicciones. Mientras en el borde delantero de la célula puede ocurrir ensamblado de microfilamentos, en el borde trasero puede estar ocurriendo desensamblado de microfilamentos. Mientras en una parte de la célula se pueden estar formando adherencias al sus-

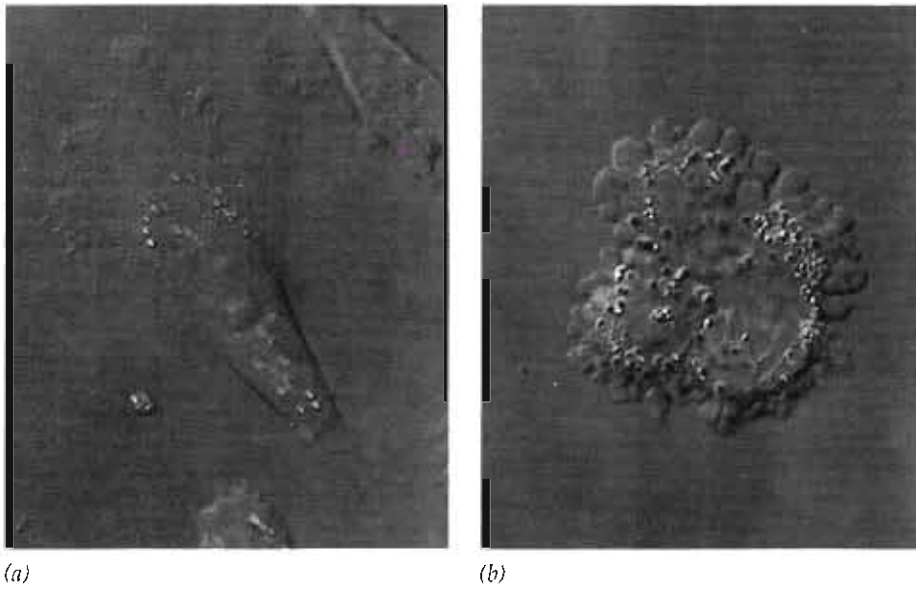


FIGURA 9-76. Demostración de requerimiento para una proteína enlazada a actina. *a)* Micrografía de luz de contraste de fases de un fibroblasto testigo que muestra la morfología normal de una célula que se arrastra. *b)* Grupo de células de melanoma maligno humano que carecen de proteína específica de enlace a actina (llamada PEA). Las células son incapaces de formar laminillas, pero en vez de eso forman burbujas esféricas en la superficie de la membrana que no está en contacto con otra célula. (Reimpreso con permiso de Thomas P. Stossel, *Science* 260:1087, 1993; copyright 1993 American Association for the Advancement of Science.)

trato, en otra parte se están rompiendo adherencias. Para comprender la locomoción celular es necesario apreciar los aspectos espaciales y temporales de los sucesos celulares. Por fortuna, se dispone de algunas técnicas que permiten a

los investigadores observar los cambios bioquímicos conforme ocurren en células vivientes que efectúan su actividad normal. Por ejemplo, se puede observar la distribución dinámica de actina no polimerizada (actina G) en comparación con la actina filamentosa (actina F) en células vivientes a medida que se desplazan. La actina G se presenta en pequeñas "reservas" concentradas detrás del borde delantero

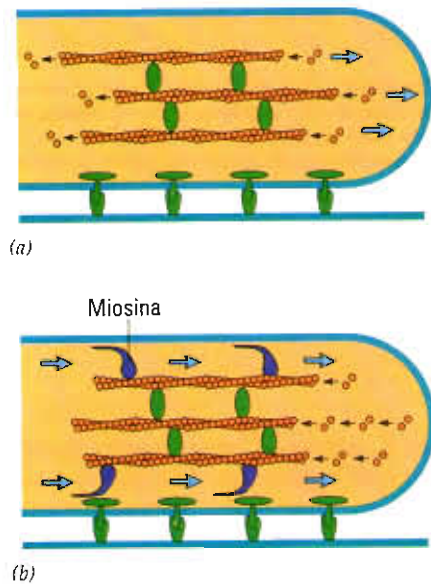


FIGURA 9-77. Dos mecanismos para generar fuerzas que conducen a la formación de prolongaciones en el borde anterior de la célula móvil. *a)* Diagrama que muestra cómo la polimerización de los filamentos de actina en los bordes de la célula puede generar fuerzas móviles. En este modelo, las fuerzas se originan a partir de un mecanismo de cremallera en el cual los monómeros de actina se introducen entre los extremos de los filamentos de actina y el borde de la célula. *b)* En un mecanismo alterno, las fuerzas se generan por motores de miosina que actúan sobre filamentos de actina, los cuales se deslizan hacia el borde delantero de la célula. (Según J. Lee, A. Ishihara y K. Jacobson, *Trends in Cell Biol.* 3:368, 1993.)

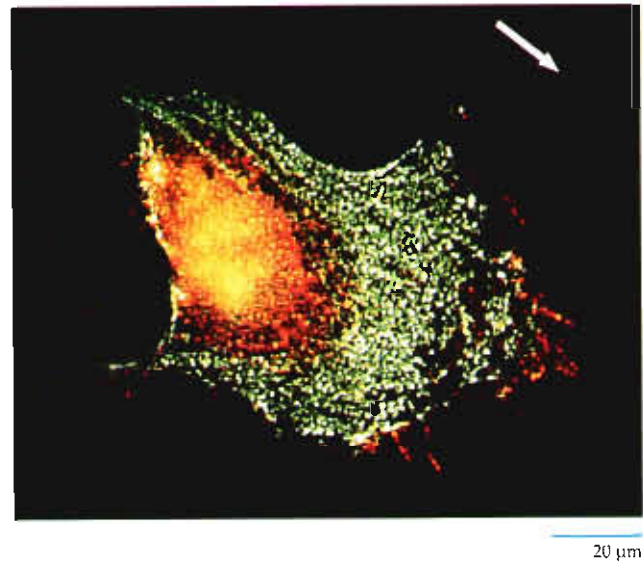
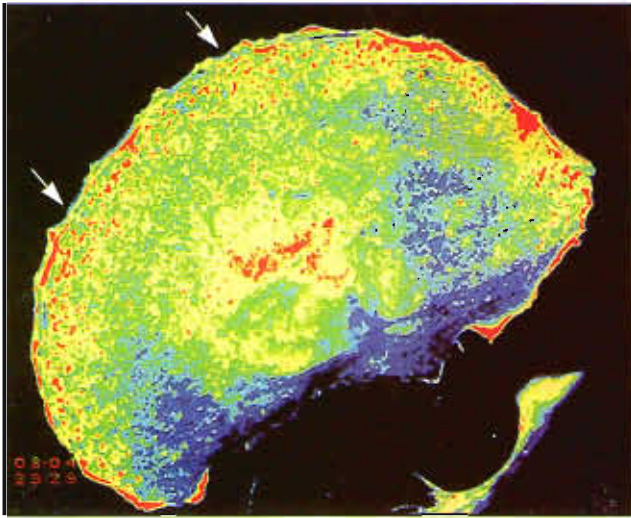


FIGURA 9-78. Localización de la miosina I y la II en una célula móvil. Utilizando anticuerpos conjugados a diferentes colorantes fluorescentes, se observa la miosina I (rojo) localizada principalmente dentro del borde anterior de este fibroblasto migratorio, en tanto que la miosina II (verde) se localiza más cerca de la parte posterior de la célula. La dirección de la migración está indicada por la flecha. (Según Patricia A. Conrad y cols. *J. Cell Biol.* 120:1389, 1993; con permiso de Rockefeller University Press.)

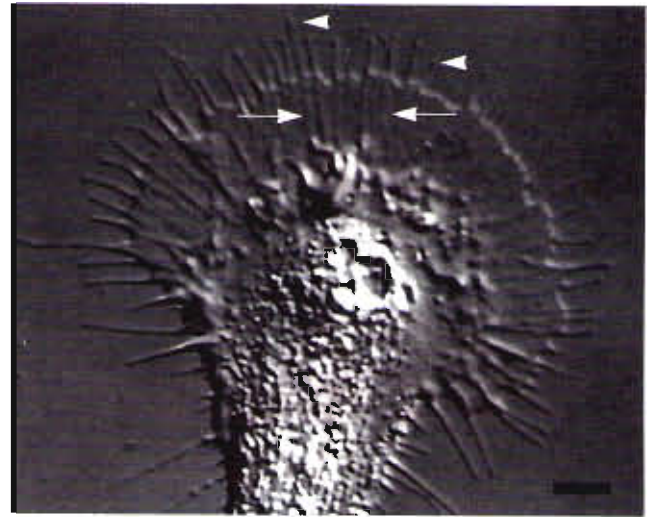


20 µm

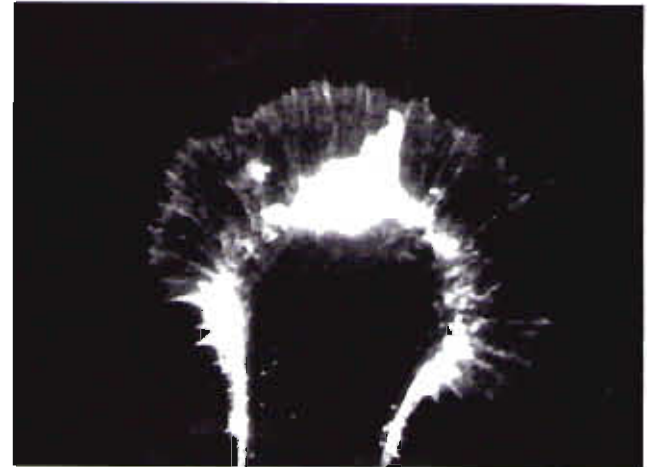
FIGURA 9-79. Distribución relativa de la actina filamentos y la no filamentos en una célula epitelial móvil. La actina no filamentos (actina G) se localizó observando la distribución de una proteína que se une específicamente a la actina monomérica. La actina filamentos se localizó observando la localización de la toxina faloidina de un hongo, que se enlaza específicamente a filamentos de actina. La proporción entre los dos se calculó y se muestra en color; el rojo indica una región con alto porcentaje de actina G y el azul un elevado porcentaje de actina F. El frente de la célula está indicado por flechas. Los pequeños grupos de actina no filamentos se encuentran en una banda justo por detrás del borde delantero del lamelipodio. Estos grupos pueden suministrar una elevada concentración de actina G secuestrada para el ensamblado rápido en filamentos implicados en la actividad del lamelipodio. (Según Long-guang Cao, Douglas J. Fishkind y Yu-li Wang, *J. Cell Biol.* 123:178, 1993; con permiso de Rockefeller University Press.)

de una célula (fig. 9-79), donde presumiblemente está unida a una proteína secuestradora de monómeros que evita su polimerización espontánea (pág. 369). Se cree que conforme la célula se desplaza hacia adelante pasan señales desde la superficie celular al interior de la corteza de la

célula para promover la polimerización de actina G en el borde delantero y la formación de prolongaciones celulares (como en la figura 9-75). Deben recibirse otras señales que desencadenen la despolimerización de la red de actina con-



(a)



(b)



(c)

10 µm

FIGURA 9-80. Estructura de un cono de crecimiento; extremo móvil de un axón en crecimiento. *a)* Imagen en video de un cono vivo en crecimiento. El extremo terminal se extiende en forma de un lamelipodio aplanado que se arrastra hacia adelante sobre el sustrato. Se pueden observar microespiigas (flechas) parecidas a barras dentro del velo transparente del lamelipodio de una fina prolongación denominada filopodio (cabeza de flecha) que puede observarse proyectándose hacia adelante del borde delantero del lamelipodio. Barra, 5 µm. *b)* El mismo cono de crecimiento mostrado en *a* luego de fijar y colorear la célula para actina F utilizando faloidina fluorescente. Los filamentos de actina se concentran en la región basal del lamelipodio y se alinean con los filopodios. También se observa actina filamentos a lo largo del borde externo del lamelipodio, que se arrastra hacia afuera sobre el sustrato. *c)* El mismo cono de crecimiento de *a* y *b* teñido por inmunofluorescencia en busca de microtúbulos. Los microtúbulos se concentran en el dominio central del axón, pero están ausentes sobre todo del lamelipodio. El borde externo del lamelipodio está indicado por los asteriscos en *c*. (Según Paul Forscher y Stephen J. Smith, *J. Cell Biol.* 107:1508, 1988.)

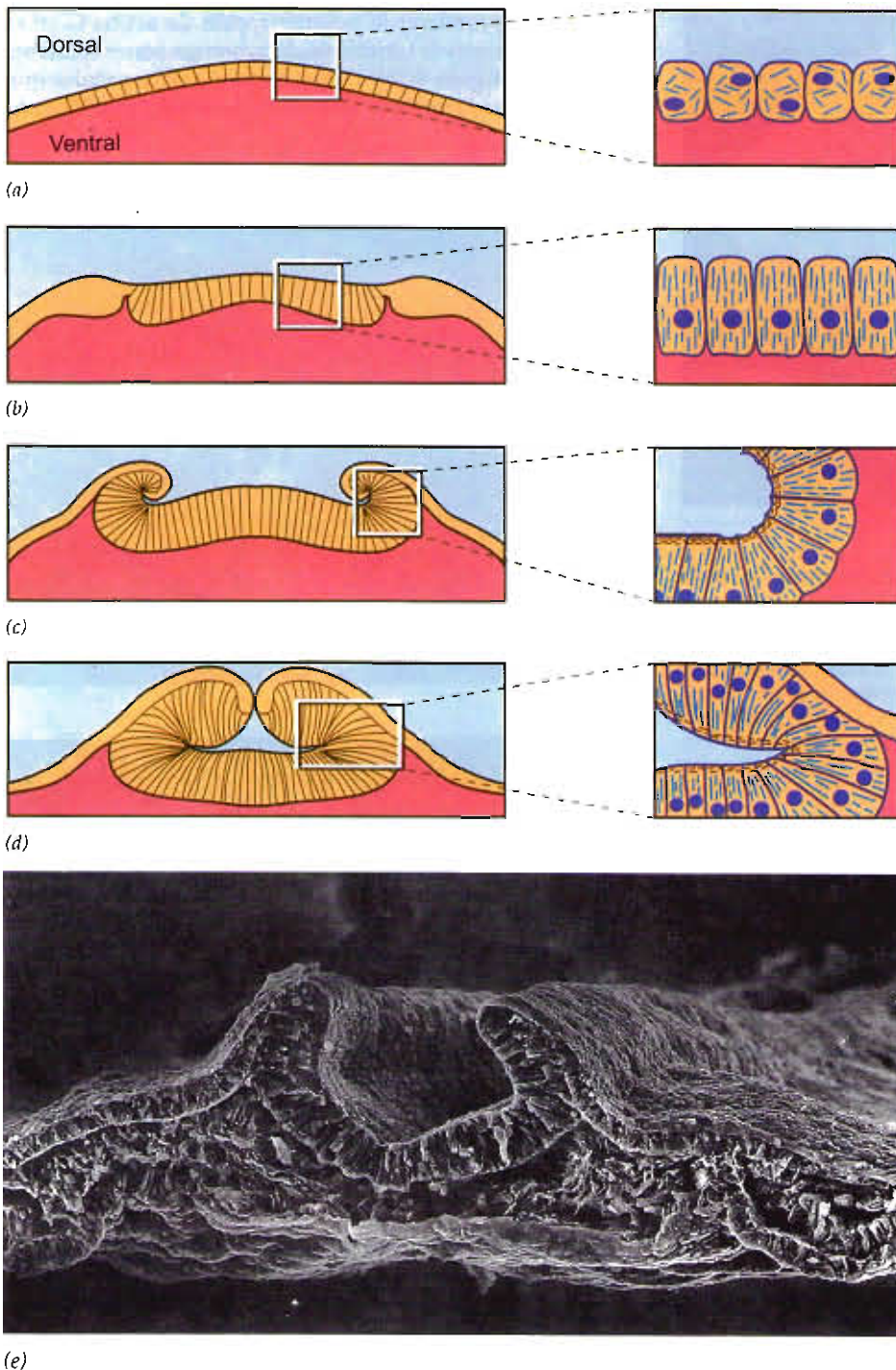


FIGURA 9-81. Etapas tempranas en el desarrollo del sistema nervioso de los vertebrados. *a-d*) Dibujos de los cambios en la forma de la célula que causan la formación de una capa de células ectodérmicas aplanadas en la región mediodorsal del embrión que se enrolla para formar el tubo neural. El cambio inicial en la altura de las células se cree que es gobernado por la orientación y alargamiento de los microtúbulos, en tanto que el enrollamiento de la placa para formar un tubo puede ser controlado por fuerzas contráctiles generadas por filamentos de actina en los extremos apicales de las células. *e*) Gamma-grafía electrónica de la superficie dorsal de un embrión de pollo conforme su placa neural se pliega para formar un tubo. (*e*: Cortesía de Kathryn W. Tosney.)

forme se mueve hacia el interior de la célula. Una vez ensamblados los filamentos de actina, sus movimientos pueden ser controlados por fuerzas generadas por las moléculas acompañantes de miosina.

Inhibición del movimiento por contacto. En cultivo de células se puede observar una característica importante de la locomoción celular cuando una célula móvil hace contacto con otra. Al contacto sigue inhibición espectacular de

la actividad ondulatoria de las membranas rugosas en la superficie de los lamelipodios y cese inmediato de la locomoción. Esta conducta se denomina **inhibición del movimiento por contacto**. Los acontecimientos subsecuentes dependen del tipo de células cultivadas. Los fibroblastos de ordinario detienen su movimiento durante pocos minutos, pero estas células pronto desarrollan lamelipodios activos en otros sitios de su superficie que provocan movimiento

en nuevas direcciones. Por otra parte, las células epiteliales casi siempre permanecen en estrecho contacto sobre la superficie del plato de cultivo. Conforme se une al agregado un número cada vez mayor de células epiteliales, la población se transforma en una capa cohesiva de células no diferentes a las capas de células epiteliales formadas dentro del cuerpo.

Crecimiento axonal

En 1907, Ross Harrison, de la Yale University, efectuó uno de los experimentos clásicos en biología. Harrison quitó un pequeño pedazo de tejido del sistema nervioso de un embrión de rana en desarrollo y colocó el fragmento en una pequeña gota de líquido linfático. En los siguientes días Harrison observó el tejido con el microscopio y encontró que las células nerviosas no sólo permanecieron saludables, sino que muchas de ellas desarrollaron prolongaciones hacia el medio circundante. Fue la primera vez que se mantuvieron células vivas en cultivo de tejidos, pero este experimento también suministró suficientes pruebas de que los axones, que en el cuerpo pueden extenderse varios metros desde el sistema nervioso central hacia los tejidos periféricos, se forman mediante un proceso de crecimiento y alargamiento.

El extremo de un axón en etapa de alargamiento es muy diferente del resto de la célula. Aunque al exterior la masa del axón muestra muy pocas pruebas de actividad, el extremo, o **cono de crecimiento**, recuerda un fibroblasto movable que se arrastra de manera activa. El examen atento del cono viviente en crecimiento muestra la presencia de varios tipos de protrusiones locomotoras: lamelipodios amplios y aplanados que se deslizan hacia afuera sobre el sustrato; *microespiigas* rígidas y cortas (fig. 9-80, *a*) que apuntan hacia afuera del borde del lamelipodio, y *filopodios* muy alargados que se extienden y retraen mostrando continuamente actividad móvil. La microscopia de fluorescencia muestra que todas estas estructuras están llenas de filamentos de actina (fig. 9-80, *b*). Por otro lado, los microtúbulos no penetran al extremo del cono de crecimiento, sino que llenan el núcleo central del axón que avanza hacia la punta (fig. 9-80, *c*).

El cono de crecimiento es una región de la célula cuya función consiste en explorar el ambiente y prolongar el axón.

Dentro del embrión, los axones de neuronas en desarrollo crecen a lo largo de vías definidas siguiendo ciertas características topográficas del sustrato o respondiendo a la presencia de sustancias químicas que se difunden hacia su camino. Los lamelipodios y filopodios del cono de crecimiento responden a la presencia de estos estímulos físicos y químicos provocando que los axones en busca de camino crezcan en la dirección que los lleva al órgano específico que deben innervar.

Cambios morfológicos en la célula durante el desarrollo embrionario

Cada parte del cuerpo tiene una forma característica y una arquitectura interna construidas durante el desarrollo embrionario: básicamente la médula espinal es un tubo hueco, el riñón consta de túbulos microscópicos, cada pulmón se compone de espacios aéreos microscópicos, y así sucesivamente. Numerosas actividades celulares se encargan del desarrollo de la morfología característica de un órgano, incluyendo cambios programados en la forma de la célula. Los cambios morfológicos de la célula se efectúan principalmente mediante cambios en la orientación de los elementos citoesqueléticos del interior celular. En las primeras etapas del desarrollo del sistema nervioso se observa uno de los mejores ejemplos de este fenómeno.

Hacia el final de la gastrulación en los vertebrados, las células externas (ectodérmicas) situadas a lo largo de la superficie dorsal del embrión se alargan, formando una elevada capa epitelial denominada *placa neural*. El alargamiento de las células de la placa neural (fig. 9-81, *a, b*) se logra por ensamblado de microtúbulos orientados con su eje longitudinal paralelo al de la célula (recuadro, figura 9-81, *b*). Después de su alargamiento las células del epitelio neural quedan confinadas a un extremo, adoptando forma de cuña, y toda la capa de células se incurva hacia adentro (fig. 9-81, *c*). Este último cambio morfológico celular se efectúa gracias a la contracción de una banda de microfilamentos ensamblados en la región cortical de las células justo por debajo de la membrana apical (recuadro, figura 9-81, *c*). Con el tiempo, la incurvación del tubo neural provoca que los bordes externos entren en contacto para formar un tubo cilíndrico hueco (fig. 9-81, *d, e*) que da lugar a todo el sistema nervioso del animal.

LA VIA EXPERIMENTAL

El motor molecular que impulsa el transporte axonal rápido

Teóricamente, la resolución máxima posible con el microscopio de luz es una propiedad que depende de la longitud de onda de la luz y es de casi $0.2 \mu\text{m}$. Por consiguiente, si dos objetos están separados por una distancia menor de $0.2 \mu\text{m}$ no pueden observarse como objetos distintos con el microscopio de luz (sección 17-1). Hacia 1970, las compañías ópticas habían producido lentes capaces de lograr la máxima resolución posible con el microscopio de luz. Pero también se disponía de una nueva tecnología para superar esa limitación.

La mayor parte de los microscopios compuestos poseen un par de lentes oculares a través de los cuales el observador visualiza el campo, y un tercer lente ocular donde se coloca una cámara para fotografiar el campo. Con el desarrollo de la videotecnología portátil fue posible sustituir la cámara de cine por una cámara de video y observar lo que ocurre bajo el microscopio en una pantalla de televisión. La cámara de video no sólo suministra una nueva manera de emplear el microscopio de luz, sino que incrementa mucho el límite de resolución del instrumento.^{1,2} Hay varias razones para este fenómeno, y la más notable es que las cámaras de video aumentan notablemente el contraste de los objetos en el campo de modo que su tamaño relativo aparezca amplificado y sus bordes muy distintos. Cuando se combina la observación en video con la microscopía de contraste por interferencia diferencial (CID) (sección 17-1), se pueden resolver objetos tan pequeños como los filamentos intermedios (10 nm de diámetro) y los microtúbulos (25 nm de diámetro). La técnica se conoce como *microscopía de contraste por interferencia diferencial con amplificación por video* (MCID-CAV).

Uno de los pioneros de la videomicroscopía fue Robert Allen, del Dartmouth College. Allen se interesó por mucho tiempo en el movimiento citoplásmico, y uno de los primeros proyectos que emprendió utilizando la MCID-CAV fue el examen de la célula nerviosa viviente. Desde años antes se sabía que algunos materiales, incluyendo vesículas sinápticas, se desplazan del cuerpo celular sobre el trayecto del axón a velocidades hasta de $5 \mu\text{m}/\text{seg}$. Se pensaba que este transporte axonal rápido, como se le llama (pág. 334), ocurría a lo largo de los microtúbulos, pero no estaba claro si los microtúbulos actuaban simplemente como vías para el movimiento del organelo o participaban de manera más activa generando las fuerzas móviles. En 1982, Allen y sus colaboradores publicaron un trabajo acerca del movimiento de vesículas muy pequeñas (30 a 50 nm) sobre el trayecto del axón gigante del calamar utilizando MCID-CAV. Se observaron vesículas en movimiento continuo en una sola dirección, fuese hacia el extremo terminal (anterógrado) o hacia el cuerpo celular (retrógrado) con velocidad promedio de $2.5 \mu\text{m}/\text{seg}$ y más rápida hasta de $5 \mu\text{m}/\text{seg}$.³ Las vesículas se desplazan a lo largo de elementos

lineales, presumiblemente FI o microtúbulos, que no pudieron distinguirse.

Una de las ventajas de trabajar con axón gigante es que el citoplasma (o *axoplasma*) puede exprimirse fuera de la célula de manera no muy diferente a la extracción de pasta dental de su contenedor. El axoplasma extruido retiene muchas de las propiedades del axoplasma celular, pero es más accesible para manipular y tratar con diferentes sustancias. Por ejemplo, se observó que el movimiento de las vesículas continúa casi a la misma velocidad en el axoplasma extruido en comparación con la célula íntegra.⁴ La técnica MCID-CAV permitió observar con mayor claridad los elementos lineales que definen la vía del movimiento en el axoplasma extruido en comparación con el axón intacto. Lo más importante fue demostrar que el transporte axonal rápido puede continuar fuera de los confines de una célula intacta y probar que las moléculas se encargan de transportar organelos.

En 1985 se publicó una serie de trabajos resultado de los esfuerzos en colaboración de Ronald Vale, Bruce Schnapp, Thomas Reese y Michael Sheetz, que aclararon mucho el mecanismo del transporte axonal. Para iniciar sus estudios diluyeron axoplasma extruido añadiendo una solución salina apropiada, que no tenía el efecto de dispersar el contenido del axoplasma, de modo que los filamentos individuales podían observarse con mayor facilidad utilizando MCID-CAV.⁵ En estas condiciones, vesículas de tamaño muy variable se desplazaban continuamente a lo largo de filamentos lineales a una velocidad uniforme de $2.2 \mu\text{m}/\text{seg}$, sugiriendo que el transporte axonal rápido se debe a un solo tipo de motor molecular. En algunos casos se observaron organelos desplazándose a lo largo de más de un filamento a la vez, lo que indicaba que los organelos tenían múltiples sitios de enlace para el motor. El movimiento del organelo requiere ATP. En ausencia de ATP, los organelos se inmovilizan y permanecen enlazados a los filamentos.

Vale y sus colegas desarrollaron un método para observar el movimiento de los organelos en un axoplasma extruido y luego fijar la preparación de modo que el mismo filamento y organelo observados por video se pudieran examinar con el microscopio electrónico (fig. VE 9-1, *a,b*). El examen atento reveló que los organelos podían moverse a lo largo de filamentos individuales en ambas direcciones y, en realidad, podían rebasarse sin chocar (fig. VE 9-2).⁶ Esta observación sugirió que cada filamento tiene varias vías a lo largo de las cuales se pueden mover los organelos. Los filamentos con sus organelos unidos tenían aproximadamente 25 nm de diámetro y una subestructura que sugería que eran microtúbulos.

El empleo de anticuerpos inmunofluorescentes confirmó que estaban constituidos por tubulina. Puesto que todos los

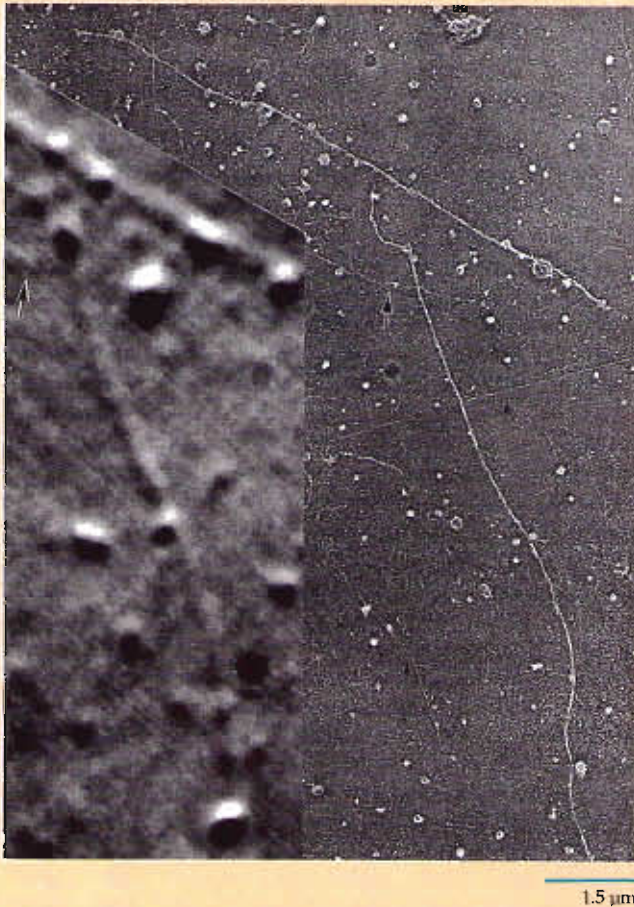


FIGURA VE 9-1. Video correspondiente (izquierda) y micrografía electrónica (derecha) de los mismos dos filamentos observados por video que participan en el transporte de vesículas. Se muestran ambas imágenes a la misma amplificación; la diferencia en el tamaño de los filamentos ilustra la forma en la cual la microscopía de video amplifica el tamaño aparente de los objetos pequeños. (Las flechas indican los filamentos más pequeños irrelevantes para el análisis.) (Según B.J. Schnapp y cols. *Cell* 40:458, 1985; con permiso de Cell Press.)

protofilamentos de un microtúbulo se orientan en la misma dirección y los organelos pueden desplazarse en ambas direcciones a lo largo de un microtúbulo, algún factor distinto del propio microtúbulo debe definir la dirección del movimiento. La atención se volvió a una proteína motora que pudiera desplazarse a lo largo de un microtúbulo. Para 1985 se había aislado y caracterizado la dineína como proteína motora causante del movimiento ciliar (pág. 346), y estudios efectuados en huevos del erizo de mar indicaban que también podía existir una forma citoplásmica de dineína. Pero era poco probable que, incluso si la dineína fuera la encargada del movimiento citoplásmico del organelo, pudiera transportar materiales en ambas direcciones a lo largo del mismo microtúbulo.

En una publicación subsecuente, Vale y sus colegas reconstituyeron con éxito un sistema de transporte axonal con ingredientes separados.⁷ Los microtúbulos que fueron utiliza-



FIGURA VE 9-2. Secuencia de las micrográficas de video que muestran movimiento bidireccional de organelos (triángulos) sobre los filamentos orientados verticalmente mostrados en la figura VE 9-1. (Según B.J. Schnapp y cols. *Cell* 40:458, 1985; con permiso de Cell Press.)

dos como "rieles" para el movimiento se prepararon a partir de tubulina soluble polimerizada en presencia de taxol, un fármaco que promueve el ensamblado y estabiliza el polímero (pág. 342). A continuación se extrajeron los microtúbulos ensamblados con 1 M de NaCl para eliminar las proteínas no tubulina que pudieran acompañar a las estructuras. El análisis subsecuente de la proteína de estos microtúbulos mostró que constan principalmente de tubulina.

El axoplasma obtenido de cerebro de calamar se separó en varias fracciones mediante centrifugación a través de un gradiente con varias concentraciones (densidades) de sacarosa. Una de las fracciones (recolectada en el límite entre las capas de sacarosa de 15 y 35%) contenía vesículas membranosas de dimensiones correspondientes al intervalo que se sabe son transportadas *in vivo* (0.05 a 0.5 μm). Cuando se añadió esta fracción de organelos a la fracción purificada de microtúbulos en presencia de ATP, prácticamente no se observó movimiento de los organelos.

Se obtuvo una segunda fracción de axoplasma del sobrenadante acumulado en la parte superior del tubo luego de la centrifugación a través del gradiente de sacarosa. Este sobrenadante (designado S2) contenía una mezcla compleja de polipéptidos, según mostró la electroforesis en gel de poliácridamida (EGPA), pero se encontraba libre de organelos, microtúbulos y filamentos más pequeños. Cuando se mezcló el sobrenadante S2 con la fracción de organelos y microtúbulos purificados en presencia de ATP, los organelos comenzaron a fijarse a los microtúbulos y a desplazarse a lo largo de los mismos. A diferencia de los resultados con axoplasma extruido, el movimiento de organelos promovido por el sobrenadante S2 ocurrió en una sola dirección y a lo largo de un solo microtúbulo.

No sólo los organelos se desplazaron a lo largo de los microtúbulos, sino que también lo hicieron los propios microtúbulos a lo largo de la superficie del cubreobjetos de vidrio (fig. VE 9-3). El movimiento de los microtúbulos requiere la adición del sobrenadante S2, no así el de los organelos. Cuando se colocó una pequeña gota de sobrenadante sobre un cubreobjetos de vidrio durante unos pocos minutos y luego se lavó cuidadosamente el cubreobjetos y se secó con papel absorbente antes de añadir los microtúbulos, se observó que los microtúbulos aún se mueven sobre el cubreobjetos en presencia de ATP. Esto indica que el factor del sobrenadante que

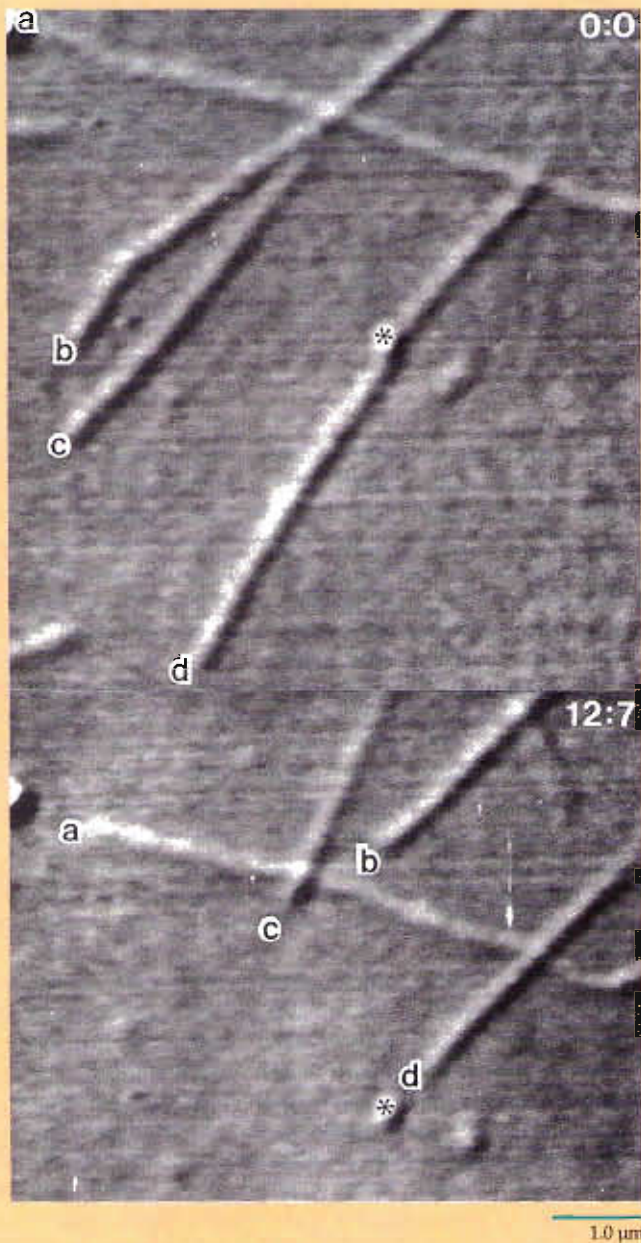


FIGURA VE 9-3. Movimiento de los microtúbulos purificados a lo largo de una superficie de vidrio en presencia del sobrenadante S2. Se indican los tiempos transcurridos en la parte superior derecha en segundos; décimas de segundo. Se pueden observar tres microtúbulos designados b, c y d, que se mueven diagonalmente desde el extremo inferior izquierdo hasta el superior derecho, en tanto que otro microtúbulo (a) se mueve horizontalmente. Un organelo (*) fijo al cubreobjetos suministra un punto de referencia estacionario. (Según R.D. Vale y cols. *Cell* 40:564, 1985; con permiso de Cell Press.)

promueve el movimiento puede adherirse al vidrio y todavía retener su capacidad para actuar como motor del microtúbulo. Experimentos subsecuentes indicaron que se podían incubar esferitas de látex en el sobrenadante S2 y que el agente motor

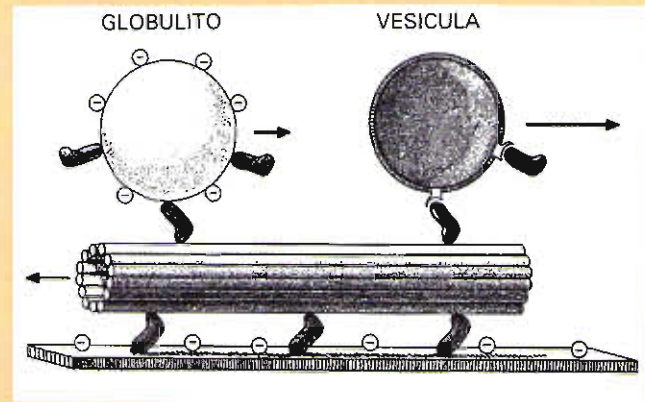


FIGURA VE 9-4. Modelo esquemático que muestra cómo una proteína motora del sobrenadante S2 puede apoyar la translocación de organelos, globulillos carboxilados y microtúbulos. La dirección de movimiento del organelo y del globulito a lo largo de los microtúbulos es opuesta a la dirección del movimiento del microtúbulo sobre el vidrio, según lo indican las flechas. (Según R.D. Vale y cols. *Cell* 40:567, 1985; con permiso de Cell Press.)

se adhiere a las esferitas. Cuando estos globulitos "recubiertos" se añadieron a los microtúbulos extendidos sobre el cubreobjetos, los globulitos se movieron en una sola dirección a lo largo de un microtúbulo estacionario. El desplazamiento de microtúbulos sobre la superficie del vidrio o de las esferitas sobre los microtúbulos requiere la adición de ATP. Si se añadiera adenil imidodifosfato (AMP-NFP), un análogo de ATP que no se hidroliza, en vez de ATP, cesaría todo movimiento. Los investigadores concluyeron que "todos estos movimientos pueden ser controlados por una sola ATPasa soluble que se enlaza de manera reversible a los organelos, globulitos o cristal y generan una fuerza translocadora sobre el microtúbulo". El componente soluble que promueve el movimiento de los organelos es sensible a tripsina y a la desnaturalización por calor, lo que indica que es una proteína, la cual presumiblemente actúa de manera similar a tripsina o dineína. El desarrollo de un sistema capaz de generar movimiento suministró el ensayo necesario para purificar la proteína motora causante de la translocación de organelos basada en microtúbulos en el sobrenadante S2. En la figura VE 9-4 se muestra un modelo del mecanismo de la proteína motora del sobrenadante que puede operar en el movimiento de globulitos, vesículas y microtúbulos.

A finales de 1985, Vale y sus colaboradores publicaron un trabajo afirmando haber purificado la proteína motora.⁸ La purificación se basó en la demostración inicial de que las partículas de axoplasma de calamar se fijan firmemente a los microtúbulos en presencia del análogo no hidrolizable de ATP, o sea, AMP-NFP.⁹ La explicación de sus resultados es que la proteína motora relacionada con estos organelos se une al microtúbulo y luego se fija porque el AMP-NFP enlazado al sitio ATPasa no se hidroliza. Si este fuera el caso, entonces sería posible purificar la proteína motora permitiendo que el sobrenadante S2 interactuara con los microtúbulos en presen-

cia de AMP-NFP. Siguiendo este protocolo, se encontró una proteína de aproximadamente 600 kD enlazada a los microtúbulos y liberada por adición de ATP. Cuando la proteína liberada se aplicó a una preparación de microtúbulos purificados, los microtúbulos se desplazaron sobre el cubreobjetos. Un análisis subsecuente de los componentes polipéptidos de la proteína indicó que era distinta de miosina y de dineína, y por lo tanto pertenecía a una nueva clase de moléculas generadoras de fuerza. Se les denominó proteínas cinesina (del griego *kinein*, mover).

En el último trabajo publicado de la serie de 1985, Vale y sus colaboradores comunicaron propiedades adicionales de la cinesina.¹⁰ Como se mencionó antes, demostraron que el sobrenadante S2 (que contiene la molécula de cinesina soluble) promueve el movimiento de organelos a lo largo de un solo microtúbulo en una sola dirección. Para determinar la dirección de la translocación fue necesario emplear microtúbulos cuyos extremos más y menos fueran identificables. Esto se logró al permitir la polimerización de la tubulina purificada sobre los centrosomas *in vitro* y empleando estos microtúbulos de polaridad definida como sustrato para el movimiento de partículas. Como se analizó en la página 339, los microtúbulos crecen con sus extremos más alejándose del centrosoma y sus extremos menos en dirección a dicho centrosoma. Cuando se añadieron moléculas de cinesina unidas a globulitos de látex a estos microtúbulos, los globulitos siempre se desplazaron a lo largo de la vía microtubular desde el extremo menos al extremo más. Es evidente que la cinesina es un motor dirigido hacia el extremo más del microtúbulo. Puesto que el movimiento anterógrado dentro del axón también se dirige hacia el extremo más, los investigadores concluyeron que la cinesina era el motor encargado del transporte anterógrado de vesículas en la célula nerviosa.

Pero el movimiento de organelos en axones intactos ocurre en ambas direcciones, anterógrada y retrógrada. Recordemos que el axoplasma extruido promueve el movimiento de las partículas en ambas direcciones a lo largo de un solo microtúbulo. Cuando se incubaron globulitos de látex en una fracción solubilizada cruda (designada S1a) de tejido cerebral, estos globulitos también fueron capaces de movimientos bidireccionales a lo largo de microtúbulos únicos. Según estos datos, pareció que la fracción soluble cruda contenía tanto el motor anterógrado (cinesina) como el motor retrógrado (una proteína desconocida) y que los sucesivos pasos de purificación para pasar de S1 a S2 retiraron el motor retrógrado. Se volvió entonces la atención a tratar de distinguir entre las dos moléculas motoras.

En un experimento, se preparó un anticuerpo contra cinesina purificada.¹⁰ Las moléculas del anticuerpo se unieron posteriormente mediante enlaces covalentes a globulitos de cefarosa y se emplearon dichos globulitos para empacar una columna. La fracción cruda S1a se pasó a través de la columna, con la expectativa de eliminar las moléculas de cinesina de la fracción. Cuando se incubaron los globulitos de látex con el líquido que había pasado a través de la columna, dichos globulitos se movieron ahora a lo largo de los microtúbulos, sólo en dirección retrógrada, suministrando mayores datos de que los movimientos anterógrado y retrógrado requieren pro-

teínas motoras diferentes y que la cinesina no es el motor retrógrado.

En otro experimento, la fracción cruda S1a se trató con N-etilmaleimida (NEM) y vanadato antes de incubarla con los globulitos de látex. Los globulitos incubados con esta fracción ya no se movieron en ambas direcciones, sino sólo hacia el extremo más de los microtúbulos, o sea, en dirección anterógrada. Estos resultados indican que las proteínas motoras anterógrada y retrógrada tienen diferente sensibilidad a fármacos, proporcionando así mayores datos de que son proteínas muy diferentes. Se sabe que la N-etilmaleimida y el vanadato son agentes inactivadores de proteínas motoras similares a dineína, por lo que se plantea la posibilidad de que el motor retrógrado es una proteína semejante a dineína. La naturaleza del motor retrógrado todavía se está investigando.

En el decenio pasado se lograron considerables avances en el estudio de la estructura y función de la cinesina. La cinesina ha sido implicada en el movimiento de varios tipos diferentes de organelos membranosos en diversos tipos de células. Puesto que la cinesina es una proteína motora que causa movimiento de organelos a lo largo de los microtúbulos, los organelos translocados deben ser capaces de unirse a moléculas de cinesina. Se aisló una proteína integral de membrana en vesículas de células embrionarias de cerebro que al parecer actúa como receptor de cinesina.¹¹ A esta proteína se le dio el nombre de *quinctina*, y quizá sea parte de la familia de proteínas implicadas en el tráfico de vesículas del tipo descrito en el capítulo 8. Las bases moleculares de la acción de la cinesina todavía se investigan activamente mediante ensayos de motilidad *in vitro*. Tomados en conjunto, estos estudios han proporcionado un conocimiento considerable del mecanismo mediante el cual los organelos membranosos se desplazan de manera dirigida de una parte de la célula a otra.

BIBLIOGRAFIA

1. Allen, R.D., Allen, N.S. y Travis, J.L. 1981. Video-enhanced contrast, differential interference contrast (AVEC-DIC) microscopy: A new method capable of analyzing microtubule related motility in the reticulopodial network of *Allogromia laticollaris*. *Cell Motil.* 1:291-302.
2. Inoue, S. 1981. Video image processing greatly enhances contrast, quality, and speed in polarization-based microscopy. *J. Cell Biol.* 89:346-356.
3. Allen, R.D. y cols. 1982. Fast axonal transport in squid giant axon. *Science* 218:1127-1129.
4. Brady, S.T., Lasek, R.J. y Allen, R.D. 1982. Fast axonal transport in extruded axoplasm from squid giant axons. *Science* 218:1129-1131.
5. Vale, R.D. y cols. 1985. Movement of organelles along filaments dissociated from the axoplasm of the squid giant axon. *Cell* 40:449-454.
6. Schnapp, B.J. y cols. 1985. Single microtubules from squid axoplasm support bidirectional movement of organelles. *Cell* 40:455-462.
7. Vale, R.D. y cols. 1985. Organelle, bead, and microtubule translocations promoted by soluble factors from the squid giant axon. *Cell* 40:559-569.

8. Vale, R.D., Reese, T.S. y Sheetz, M.P. 1985. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42:39-50.
9. Lasek, R.J. y Brady, S.T. 1984. Adenyl imidodiphosphate (AMP-PNP), a non-hydrolyzable analogue of ATP produces a stable intermediate in the motility cycle of fast axonal transport. *Biol. Bull.* 167:503; later reported in *Nature* 316:645-647.
10. Vale, R.D. y cols. 1985. Different axoplasmic proteins generate movement in opposite directions along microtubules in vitro. *Cell* 43:623-632.
11. Toyoshima, I. y cols. 1992. Kinectin, a major kinesin-binding protein on ER. *J. Cell Biol.* 118:1121-1131.

SINOPSIS

El citoesqueleto se compone de tres tipos distintos de estructuras fibrosas: microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos (filamentos de actina), que participan en varias actividades celulares. En conjunto, los elementos del citoesqueleto actúan como apoyo estructural que ayuda a mantener la forma de la célula; como armazón interna encargada del acomodo de varios organelos en el interior de la célula; como parte del mecanismo requerido para el movimiento de materiales y organelos dentro de las células; como elementos generadores de fuerza encargados del movimiento de las células de un sitio a otro; como sitios para fijar RNAm y facilitar su traducción en polipéptidos, y como transductor de señales, transmitiendo información de la membrana celular al interior de la célula (p. 325).

La microscopia de fluorescencia, la videomicroscopia, los ensayos de motilidad *in vitro*, la microscopia electrónica, y el empleo de la biología molecular y de mutantes genéticos han demostrado utilidad especialmente en el estudio del citoesqueleto. La microscopia de fluorescencia se emplea para estudiar la dinámica del citoesqueleto siguiendo el destino de las proteínas citoesqueléticas marcadas con fluorescencia e inyectadas a células vivientes, o por el empleo de anticuerpos fluorescentes u otras sondas para localizar componentes citoesqueléticos específicos dentro de células o cortes de tejido fijados. También se puede usar la videomicroscopia para visualizar los elementos del citoesqueleto mediante microscopio de luz, lo que permite a los investigadores estudiar las actividades de las proteínas motoras utilizando ensayos de motilidad *in vitro* (p. 327).

Se han identificado y caracterizado tres familias de proteínas motoras: las cinesinas y las dineínas que se mueven a lo largo de los microtúbulos, y las miosinas que se mueven a lo largo de los microfilamentos. Estas proteínas pueden convertir la energía química almacenada en el ATP en energía mecánica para mover cargas celulares fijas al motor. Las fuerzas se generan por cambios de conformación en la proteína motora y se acoplan a un ciclo químico que implica enlace e hidrólisis de nucleótidos y la liberación de los productos enlazados (p. 329).

Los microtúbulos son estructuras cilíndricas huecas de 25 nm de diámetro que se ensamblan a partir de la proteína tubulina y, además de constituir el citoesqueleto, forman parte del huso mitótico, centríolos y el núcleo central de cilios y flagelos. Los microtúbulos son polímeros ensamblados

a partir de heterodímeros α/β -tubulina dispuestos en hileras o protofilamentos. Gran parte de las propiedades de los microtúbulos, incluyendo su flexibilidad, estabilidad y capacidad para interactuar, son influidas por miembros de un grupo de proteínas relacionadas con microtúbulos (PRM). Dada su aparente rigidez, los microtúbulos con frecuencia muestran capacidad para servir como apoyo, no distinta a la manera como las vigas de acero apoyan un edificio alto. El papel estructural de los microtúbulos es más evidente cuando se examinan prolongaciones celulares muy alargadas, como el axopodio de protozoarios y los axones de neuronas, ambas estructuras llenas con microtúbulos orientados paralelamente al eje largo de la prolongación. Los microtúbulos también funcionan en actividades tan diversas como influir el depósito de celulosa en la pared de una célula vegetal; mantener la posición de organelos membranosos en la vía biosintética, incluyendo RE y complejo de Golgi, y mover vesículas y otros materiales entre el cuerpo celular y la porción terminal del axón de una neurona (p. 330).

Cinesina y dineína citoplásmicas desplazan materiales en direcciones opuestas a lo largo de microtúbulos. Tanto la cinesina como la dineína citoplásmica son proteínas motoras grandes que poseen cabezas globulares que interactúan con los microtúbulos y funcionan como máquinas generadoras de fuerza, y un extremo opuesto que se enlaza a los tipos específicos de carga que debe transportar. La cinesina mueve materiales hacia el extremo más del microtúbulo y la dineína citoplásmica hacia el extremo menos. Se cree que la cinesina participa en el movimiento de vesículas derivadas del RE, endosomas, lisosomas y gránulos secretorios, y se ha demostrado que es la proteína motora primaria que media el transporte anterógrado en un axón (desde el cuerpo celular a la terminal del axón) (p. 334).

La nucleación *in vivo* de microtúbulos se relaciona con varios centros organizadores de microtúbulos. En células animales, los microtúbulos del citoesqueleto de ordinario se forman en un centrosoma, estructura compleja que contiene dos centríolos en forma de barril rodeados por un material amorfo pericentriolar electrónicamente denso. Los centríolos contienen nueve fibrillas regularmente espaciadas, cada una compuesta de tres microtúbulos, y que en general se presentan en pares cuyos miembros se orientan en ángulo recto entre sí. Los microtúbulos típicamente se irradian hacia afuera del material pericentriolar, que se cree contiene los elementos necesarios

para la nucleación del microtúbulo. Los microtúbulos que forman las fibras de un cilio o de un flagelo se originan de un corpúsculo basal que prácticamente tiene la misma estructura que el centriolo. Centríolos y corpúsculos basales pueden autogenerarse. Centrosomas, corpúsculos basales y otros centros organizadores de microtúbulos, como la superficie externa de la envoltura nuclear de células vegetales, comparten una proteína común llamada γ -tubulina, que al parecer desempeña un papel clave en la nucleación de microtúbulos (p. 337).

Los microtúbulos del citoesqueleto son polímeros dinámicos sujetos a acortamiento, alargamiento, desensamblado y reensamblado. Varios agentes pueden inducir desensamblado del citoesqueleto microtubular, incluyendo colchicina, temperatura fría y concentración elevada de Ca^{2+} . Los microtúbulos del citoesqueleto normalmente se desensamblan antes de la división celular y las subunidades de tubulina se reensamblan como parte del huso mitótico, el cual se desensambla luego de la división celular, y las subunidades se emplean para reensamblar el citoesqueleto. En todo momento, algunos microtúbulos del citoesqueleto están creciendo en tanto que otros se encogen. Cuando se observa continuamente un microtúbulo individual, se pueden notar fases alternas de crecimiento y encogimiento hacia atrás y adelante, fenómeno conocido como inestabilidad dinámica. Tanto el crecimiento como el encogimiento ocurren de manera predominante, si no exclusiva, en el extremo más del polímero, el extremo opuesto al centro organizador de microtúbulos. Los dímeros de tubulina ensamblados en el microtúbulo contienen una molécula GTP que se hidroliza poco después de su incorporación al polímero. Durante los periodos de ensamblado rápido, la hidrólisis del GTP enlazado a los dímeros de tubulina incorporados retrasan la incorporación de nuevos dímeros, de modo que el extremo del microtúbulo está recubierto por un casquete de dímeros de tubulina-GTP que favorece la adición de nuevas subunidades y el crecimiento del microtúbulo. Ensamblado y desensamblado también pueden ser operados por la concentración de Ca^{2+} y la presencia de PRM específicos (p. 340).

Cilios y flagelos contienen una estructura central, el axonema, compuesta de una disposición de microtúbulos que apoyan al organelo conforme se prolonga desde la superficie celular y constituye el mecanismo para generar las fuerzas requeridas para la locomoción. En sección transversal, se observa que un axonema consta de nueve dobletes de microtúbulos en el exterior (un microtúbulo A completo y un microtúbulo B incompleto) rodeando un par de microtúbulos sencillos. Un par de brazos se proyecta desde el microtúbulo A de cada doblete. Los brazos se componen de dineína ciliar, una proteína motora que utiliza la energía liberada por hidrólisis de ATP para generar las fuerzas requeridas para inclinar los cilios o los flagelos. Esto se logra por unión de los brazos de dineína de un doblete al microtúbulo B del doblete vecino y por un cambio de conformación que obliga al microtúbulo A a deslizarse una distancia perceptible. A continuación el brazo de dineína se separa del túbulo B y vuelve a unirse a otro sitio para empezar un nuevo ciclo. El deslizamiento sobre un lado del axonema alterna con el deslizamiento sobre el otro lado, de modo que una parte del cilio o del flagelo primero se inclina en una dirección y luego en la dirección opuesta. Se ha demostrado

directamente el deslizamiento de microtúbulos uniendo globulitos a los dobletes de axonemas desmembrados y observando sus movimientos relativos luego de reactivación. La dirección y velocidad de los latidos ciliares o flagelares son reguladas por iones calcio y AMP cíclico (p. 344).

Los filamentos intermedios (FI) son estructuras citoesqueléticas semejantes a cuerdas de casi 10 nm de diámetro que, según el tipo de célula, pueden componerse de diversas subunidades de proteínas capaces de ensamblarse en tipos similares de filamentos. A diferencia de los microtúbulos, los filamentos se componen de bloques de construcción simétricos (subunidades tetraméricas), que se ensamblan en filamentos que carecen de polaridad. Los FI son resistentes a fuerzas de tracción y relativamente insolubles, pero igual que los otros dos tipos de elementos citoesqueléticos, son estructuras dinámicas que incorporan rápidamente subunidades marcadas con fluorescencia e inyectadas a las células. Se piensa que ensamblado y desensamblado son controlados sobre todo por fosforilación y desfosforilación. Se cree que los FI suministran estabilidad mecánica a las células y proporcionan funciones especializadas a tejidos específicos (p. 351).

Los filamentos de actina (o microfilamentos) tienen 8 nm de diámetro, se componen de una doble hélice de polímero de la proteína actina, y desempeñan un papel clave prácticamente en todos los tipos de contractilidad y motilidad dentro de la célula. Según el tipo de célula y la actividad, los filamentos de actina se pueden organizar en disposiciones muy ordenadas, redes laxas mal definidas, o haces firmemente reunidos. Con frecuencia los filamentos de actina se identifican por su capacidad para unirse a fragmentos específicos de miosina (MMP o cabezas S1) que también revelan la polaridad del filamento. Aunque ambos extremos de un filamento de actina pueden ganar o perder subunidades, el extremo barbucho (o extremo más) del filamento es el sitio preferido para la adición de subunidades y el extremo puntiagudo (o extremo menos) es el sitio preferido para la pérdida de subunidades. Para que una subunidad de actina se incorpore al extremo en crecimiento de un filamento, debe enlazarse a un ATP que se hidroliza poco después de su incorporación. Se cree que el ensamblado de los microfilamentos, igual que el de los microtúbulos, es ayudado por la presencia de un casquete de actina-ATP en el extremo en crecimiento. Las células mantienen equilibrio dinámico entre las formas monomérica y polimérica de actina, que puede alterarse por cambios en varias condiciones locales. El papel de los filamentos de actina en un proceso particular se puede probar fácilmente tratando las células con una citocalasina, que promueve la despolimerización del filamento, o con faloidina, que evita su desensamblado y participación en actividades dinámicas (p. 354).

Las fuerzas encargadas de procesos dependientes del microfilamento se pueden generar por ensamblado del filamento de actina o, con mayor frecuencia, como resultado de la interacción con la proteína motora miosina. La reacción acrosómica, que ocurre en el extremo de un espermatozoide justo antes de la fertilización, y la propulsión de ciertas bacterias a través del citoplasma de un fagocito infectado, son dos procesos gobernados por la polimerización de actina. Las miosinas

9. Contrastar los movimientos de un flagelo y de un cilio. Describir los mecanismos mediante los cuales estos organelos pueden sufrir movimientos de inclinación. ¿Cuál es el papel de los puentes entre los dobletes (nexinas) en estos movimientos? ¿Cuál es el papel de la base de las moléculas de dineína?
10. ¿Cómo pueden influir los iones calcio y el AMPc en la velocidad y dirección de los latidos ciliares?
11. Contrastar los papeles de la miosina I y la miosina II en las actividades celulares.
12. Describir la estructura de la sarcómera de una miofibrilla muscular esquelética y los cambios que ocurren durante su contracción.
13. Describir los pasos que ocurren entre el momento que un impulso nervioso se transmite a través de una unión neuromuscular y el momento en que la fibra neuromuscular realmente comienza a acortarse. ¿Cuál es el papel de los iones calcio en este proceso?
14. Elaborar una lista de varios tipos de proteínas unidas a actina y una función de cada tipo.
15. Contrastar el movimiento de una ameba con el de una célula de mamífero que se arrastra sobre un sustrato.
16. Describir el papel de los filamentos de actina en las actividades del cono de crecimiento de una neurona.

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. Si se tira de una miofibrilla de modo que la sarcómera aumente su longitud casi 50%, ¿qué efecto se esperaría que tuviera sobre la capacidad contráctil de la miofibrilla? ¿Por qué? ¿Qué efectos tendría sobre las bandas H, A e I?
2. Supongamos que usted está estudiando el movimiento de un axonema ciliar desmembrado y olvidó añadir ATP a la mezcla de incubación. ¿Qué efecto esperaría sobre la posición de los brazos de dineína? ¿Por qué?
3. ¿Cuáles son los dos tipos de motilidad no muscular que pueden ser afectados por los anticuerpos contra miosina I y miosina II? ¿Por qué?
4. Un centríolo contiene _____ microtúbulos completos y un cilio tiene _____ microtúbulos completos.
5. Si el modelo de nucleación de los microtúbulos mediante γ -tubulina de la figura 9-25 fuera correcto, ¿qué podría concluirse acerca de la estructura de los extremos más de un microtúbulo citoesquelético?
6. Elaborar una lista de cuatro cosas que se podría hacer para cambiar el equilibrio dinámico de una preparación *in vitro* de tubulina y de microtúbulos hacia la formación de microtúbulos. Elaborar una lista de cuatro tratamientos que cambiarían el equilibrio en la dirección opuesta.
7. Se mencionó que el axonema ciliar o flagelar desmembrado puede latir con una frecuencia y patrón normales. ¿Se podría concluir que la membrana plasmática no es importante en la función de los cilios o de los flagelos?
8. Puesto que se observa que las vesículas citoplásmicas se mueven en ambas direcciones dentro de un axón, ¿se podría concluir que algunos microtúbulos están orientados con sus extremos más enfrentando al axón terminal y otros orientados por la polaridad opuesta?
9. ¿Estaría usted de acuerdo con la afirmación de que el centrosoma desempeña un papel clave para determinar la velocidad de alargamiento y acortamiento de los microtúbulos de una célula animal? ¿Por qué sí o por qué no?
10. Si usted estuviera comparando la estructura molecular de una cinesina y una dineína, ¿qué parte (cabeza o cola) esperaría que fueran más similares? ¿Por qué?
11. La figura 9-33 muestra el aspecto de una sección transversal de un axonema ciliar cortado a través de una parte interior del cilio. ¿Cómo podría diferir la imagen de una sección transversal si se hubiera cortado muy cerca del extremo de un cilio al iniciar un latido de recuperación?
12. Algunos anticuerpos capaces de enlazarse a cinesina pueden impedir el movimiento del organelo, en tanto que otros anticuerpos anticinesina parece que tienen poco efecto. ¿Cómo se podría explicar esta observación?
13. ¿Por qué piensa usted que se aprendería más acerca de la dinámica del microtúbulo inyectando tubulina fluorescente en una célula en vez de tubulina marcada con isótopos radiactivos? ¿Podría plantear una pregunta que fuera mejor respondida empleando tubulina marcada con isótopos radiactivos?
14. Supongamos que descubre que un ratón carece de las copias del gen cinesina y que aparentemente no muestra efectos nocivos y vive hasta una edad avanzada. ¿Qué se podría concluir acerca de la importancia de la cinesina en la locomoción intracelular?
15. ¿Qué tipo de tejido de vertebrados esperaría usted que fuera una fuente excelente de tubulina? ¿De actina? ¿De queratina? ¿Qué proteína esperaría usted que fuera menos soluble y más difícil de extraer? ¿Qué tipos de proteína se esperarían como contaminantes en una preparación de tubulina? ¿Cuáles en una preparación de actina?

BIBLIOGRAFÍA

Citoesqueleto en general

- Amos, L.A. y Amos, W.B. 1991. *Molecules of the Cytoskeleton*. Guilford Press.
- Bray, D. 1992. *Cell Movement*. Garland.

Cleveland, D.W. y Mooseker, M.S., eds. 1994. Cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6(1).

Cooper, J.A. y Mitchison, T.J., eds. 1995. Cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7(1).

Pollard, T.D. y Goldman, R.D. 1993. Cytoplasmic and cell motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5(1).

Warner, F.D. y cols., eds. 1989. *Cell Movement*. Liss.

Microtúbulos

Amos, L. The microtubule lattice—20 years on. *Trends Cell Biol.* 5:48-51.

Gelfand, V.L. y Bershadsky, A.D. 1991. Microtubule dynamics: mechanism, regulation, and function. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7:93-116.

Hyams, J.S. y Lloyd, C.W. 1994. *Microtubules*. Wiley-Liss.

Joshi, H.C. 1993. Gamma-tubulin: The hub of cellular microtubule assemblies. *Bioess.* 15:637-643.

Kellog, D.R., Moritz, M. y Alberts, B.M. 1994. The centrosome and cellular organization. *Ann. Rev. Biochem.* 63:639-674.

Oakley, B.R. 1992. Gamma-tubulin: The microtubule organizer? *Trends Cell Biol.* 2:1-5.

Tucker, J. 1992. The microtubule-organizing center. *Bioess.* 14:861-867.

Filamentos intermedios

Albers, K. y Fuchs, E. 1992. The molecular biology of intermediate filament proteins. *Int. Rev. Cytol.* 134:243-279.

Brady, S.T. 1993. Motor neurons and neurofilaments in sickness and in health. *Cell* 73:1-3.

Fuchs, E. y Coulombre, P.A. 1992. Of mice and men: Genetic skin disease of keratin. *Cell* 69:899-902.

Fuchs, E. y Weber, K. 1994. Intermediate filaments: Structure, dynamics, function, and disease. *Ann. Rev. Biochem.* 63:345-382.

Shoeman, R.L. y Traub, P. 1993. Assembly of intermediate filaments. *Bioess.* 15:605-611.

Steinert, P.M. 1993. Structure, function, and dynamics of keratin intermediate filaments. *J. Invest. Dermatol.* 100:729-734.

Motores moleculares

Bernstein, M. y Rosenbaum, J.L. 1994. Kinesin-like proteins in the flagella of Chlamydomonas. *Trends Cell Biol.* 4:236-240.

Endow, S.A. y Titus, M.A. 1992. Genetic approaches to molecular motors. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8:29-66.

Howard, J. 1993. One giant step for kinesin. *Nature* 365:696-697.

Howard, J. 1994. Clamping down on myosin. *Nature* 368:98-99.

Huxley, A.F. 1995. Crossbridge titling confirmed. *Nature* 375:631-632.

Jiang, M.Y. y Sheetz, M.P. 1994. Mechanics of myosin motor: Force and step size. *Bioess.* 16:531-532.

Pollard, T.D. 1993. Proteins as machines. *Nature* 355:17-18.

Rayment, Y. y Golden, H.M. 1994. The three-dimensional structure of a molecular motor. *Trends Biochem. Sci.* 19:129-134.

Salmon, E.D. y cols. 1995. A decade of kinesin. *Trends Cell Biol.* 5:154-175.

Schnapp, B.J. 1995. Molecular motors: Two heads are better than one. *Nature* 373:655-656.

Spudich, J.A. 1994. How molecular motors work. *Nature* 372:515-518.

Svodoba, K. y cols. 1993. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature* 365:721-727.

Tan, J.L., Ravid, S. y Spudich, J.A. 1992. Control of nonmuscle myosins by phosphorylation. *Ann. Rev. Biochem.* 61:721-759.

Vale, R.D. 1993. Measuring single protein motors at work. *Science* 260:169-170.

Walker, R.A. y Sheetz, M.P. 1993. Cytoplasmic microtubule-associated motors. *Ann. Rev. Biochem.* 62:429-451.

Filamentos de actina y proteínas enlazadas a la actina

Fechheimer, M. y Zigmond, S.H. 1993. Focusing on unpolymerized actin. *J. Cell Biol.* 123:1-5.

Janmey, P. 1993. A slice of the actin. *Nature* 364:675-676.

Luna, E.J. y Hitt, A.L. 1992. Cytoskeleton-plasma membrane interactions. *Science* 258:955-964.

Safer, S. y Nachmias, V.T. 1994. Beta thymosins as actin binding proteins. *Bioess.* 16:473-479.

Small, J.V. 1995. Getting the actin filaments straight: Nucleation-release or treadmilling? *Trends Cell Biol.* 5:52-55.

Sohn, R.H. y Goldschmidt-Clermont, P.J. 1994. Profilin: At the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton. *Bioess.* 16:465-472.

Wertman, K.F. y Drubin, D.G. 1992. Actin constitution: Guaranteeing the right to assemble. *Science* 258:759-760.

Cilios y flagelos

Asai, D.J. y Brokaw, C.J. 1993. Dynein heavy chain isoforms and axonemal motility. *Trends Cell Biol.* 3:398-402.

Gibbons, I.R. 1981. Cilia and flagella of eukaryotes. *J. Cell Biol.* 91:107s-124s.

Satir, P., Barkalow, K. y Hamasaki, T. 1993. The control of ciliary beat frequency. *Trends Cell Biol.* 3:409-412.

Smith, E.F. y Sale, W.S. 1992. Regulation of dynein-driven microtubule sliding by the radial spokes in flagella. *Science* 257:1557-1559.

Tamm, S. 1994. Ca²⁺ channels and signalling in cilia and flagella. *Trends Cell Biol.* 4:305-310.

Warner, F.D. y cols. 1989. *Cell Movement: The dynamic ATPases*. Liss.

Contractilidad muscular

Blake, K.J. y cols. 1994. The emerging family of dystrophin-related proteins. *Trends Cell Biol.* 4:19-23.

Dulhunty, A.F. 1992. The voltage-activation of contraction in skeletal muscle. *Prog. Biop. Mol. Biol.* 57:181-223.

Ebashi, S. 1991. Excitation-contraction coupling and the mechanism of muscle contraction. *Ann. Rev. Physiol.* 53:1-16.

Rayment, I. y cols. 1993. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: A molecular motor. *Science* 261:50-58.

Taylor, E.W. 1993. Molecular muscle. *Science* 261:35-36.

Trayer, I.P. 1993. Coming soon the movie. *Nature* 364:101-103.

Motilidad no muscular

Bray, D. y cols. 1993. Cell motility. *Trends Cell Biol.* 3(11); this issue is devoted to motility.

Bretscher, A. 1991. Microfilament structure and function in the cortical cytoskeleton. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7:337-374.

Condeelis, J. 1993. Life at the leading edge: The formation of cell protrusions. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9:411-444.

Fukui, Y. 1993. Toward a new concept of cell motility: Cytoskeletal dynamics in amoeboid movement and cell division. *Int. Rev. Cytol.* 144:85-127.

Lee, J., Ishihara, A. y Jacobson, K. 1993. How do cells move along surfaces. *Trends Cell Biol.* 3:366-370.

Stosel, T.P. 1993. On the crawling of animal cells. *Science* 260:1086-1094.

Naturaleza del gen y del genoma

- 10-1 Cromosomas: portadores físicos de los genes
- 10-2 Naturaleza química del gen
- 10-3 Estructura del genoma
- 10-4 Estabilidad del genoma
- 10-5 Mapas moleculares del genoma

La perspectiva humana: Mapeo del genoma humano

La perspectiva humana: Corrección de trastornos genéticos mediante geneterapia

La vía experimental: Naturaleza química del gen

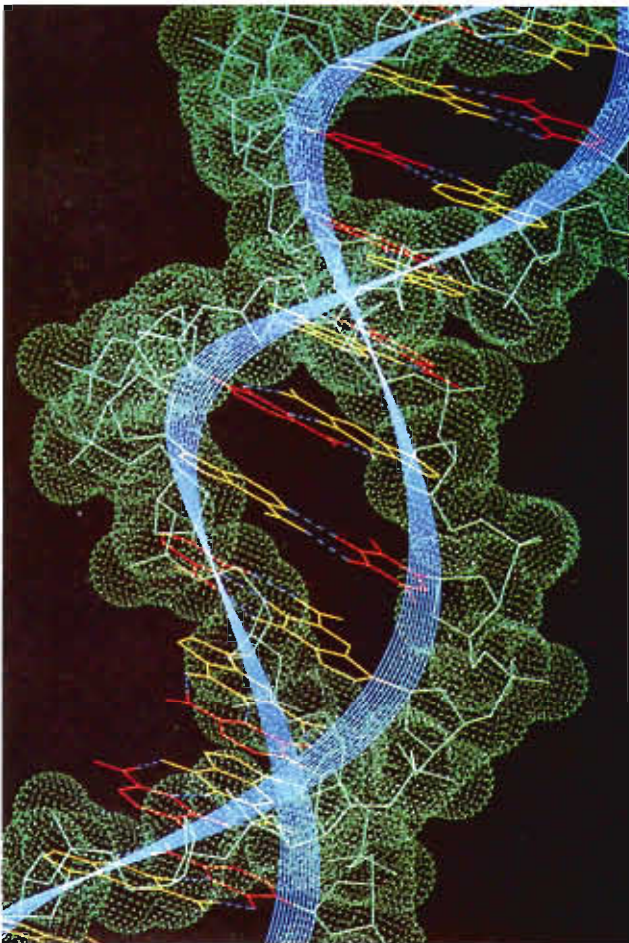


FIGURA 10-A. Imagen generada por computadora de la doble hélice de DNA. (Según Will y Deni McIntyre/Photo Researchers.)

La ciencia de la genética se inició con el trabajo de Gregor Mendel, alrededor de 1860. El laboratorio de Mendel fue un pequeño jardín en los terrenos del monasterio austriaco donde vivía. No se sabe exactamente qué motivó a Mendel a comenzar sus estudios, pero evidentemente tenía un plan experimental muy claro en la mente: su objetivo era aparear, o *cruzar*, plantas de guisante con diferentes características hereditarias y determinar el patrón de transmisión de dichas características a los descendientes. Mendel eligió guisantes de jardín como objeto de estudio por varias razones prácticas, sobre todo porque podía obtener una variedad de semillas que darían plantas con características distintas. Mendel decidió enfocarse sobre siete caracteres o rasgos claramente definibles, como altura de la planta o color de sus flores, cada uno de los cuales aparecía en dos formas alternativas que podían identificarse con claridad (cuadro 10-1). Después de varios años de cuidadosos estudios cultivando y cruzando sus plantas durante varias generaciones y contando el número de individuos que mos-

CUADRO 10-1. Los siete rasgos de las plantas de guisantes de Mendel

Rasgo	Alelo dominante	Alelo recesivo
Altura de la planta	Alta	Baja
Color de las semillas	Amarillo	Verde
Forma de las semillas	Redonda	Angular (rugosa)
Color de las flores	Púrpura	Blanco
Posición de las flores	A lo largo del tallo	En los extremos del tallo
Color de la vaina	Verde	Amarillo
Forma de la vaina	Inflada	Constreñida

traban diferentes características, Mendel llegó a las siguientes conclusiones:

1. Las características de las plantas eran gobernadas por factores (o unidades) de herencia, que más tarde llamó **genes**. Cada planta poseía dos copias del gen que controla el desarrollo de cada rasgo, uno derivado de cada progenitor. Los dos genes podían ser idénticos o no idénticos entre sí. Posteriormente estas dos formas alternativas de genes se denominaron **alelos**. Para cada uno de los siete rasgos estudiados, un alelo dominaba sobre el otro. Si ambos aparecían juntos en la misma planta, el alelo dominante enmascaraba la existencia del recesivo.
2. Cada célula reproductiva (o *gameto*) producida por una planta sólo contenía una copia del gen correspondiente a cada rasgo. Un gameto particular podía contener el alelo recesivo o el dominante para un rasgo determinado, pero no ambos. Cada planta se origina por la unión de un gameto masculino con uno femenino. Por consiguiente, de los dos alelos que gobiernan cada rasgo en una planta, uno se hereda del progenitor femenino y el otro del progenitor masculino.
3. En cada planta los dos alelos que controlan un rasgo permanecen unidos durante toda la vida, pero se separan (o *segregan*) durante la formación de los gametos. Este dato es la base de la "Ley de la segregación" de Mendel.
4. La separación del par de alelos correspondientes para un rasgo no tiene efecto sobre la separación de alelos para otro rasgo. Por ejemplo, un gameto particular puede recibir un gen paterno que controla el color de la semilla y un gen materno que controla la forma de dicha semilla. En este dato se basa la "Ley de la permutación independiente" de Mendel.

Mendel presentó los resultados de su trabajo a los miembros de la Natural History Society of Brunn, Austria; las actas de sus sesiones no registran comentario alguno de esta presentación. Mendel publicó sus experimentos en la revista de la sociedad de Brunn, en 1865, donde no generaron interés sino hasta 1900, 16 años después de su muerte. En ese año, tres botánicos europeos llegaron a las mismas conclusiones *de manera independiente* y los tres redescubrieron las publicaciones de Mendel abandonadas durante 35 años en los armarios de muchas bibliotecas por toda Europa.

10-1 Cromosomas: portadores físicos de los genes

Aunque Mendel suministró datos convincentes de que los rasgos hereditarios eran controlados por factores discretos, o genes, en sus estudios no se preocupó en absoluto de la naturaleza física de estos elementos o su localización dentro del organismo. Mendel realizó todo su proyecto de investigación sin observación alguna con el microscopio. Durante el tiempo transcurrido entre el trabajo de Mendel y su redescubrimiento, algunos biólogos se preocuparon de

este aspecto de la herencia: las bases físicas de la misma dentro de la célula.

El descubrimiento de los cromosomas

Alrededor de 1880, varios biólogos europeos observaban con atención la actividad de las estructuras celulares recién discernibles con los microscopios de luz que mejoraban con rapidez. Estos científicos no conocían el trabajo de Mendel, sin embargo concluyeron que cualquier factor que gobernara las características heredadas debía pasar de una célula a otra y de una generación a la siguiente. Este conocimiento, por sí mismo, es fundamental; toda la información genética necesaria para generar y conservar una planta o animal complejo debe estar por completo dentro de una sola célula. Observaciones efectuadas sobre células en división revelaron que los elementos del contenido citoplásmico quedan en una u otra célula hija al azar, dependiendo sólo del plano a través del cual pasa el surco que divide la célula. Por lo contrario, al parecer hay fuerte tendencia a que el contenido del núcleo se divida por igual entre las células hijas. Durante la división celular, el material del núcleo se organiza en "filamentos" visibles, que en 1888 se denominaron **cromosomas**, término que significa "corpúsculos coloreados".

Más o menos en aquel tiempo se observó el proceso de fertilización y se describió el papel de los dos gametos: espermatozoide y óvulo (fig. 10-1). Aunque el espermatozoide es una célula diminuta, se sabe que tiene igual importancia genética que el óvulo, de tamaño mucho mayor. ¿Qué tienen en común estas dos células tan diferentes? La carac-

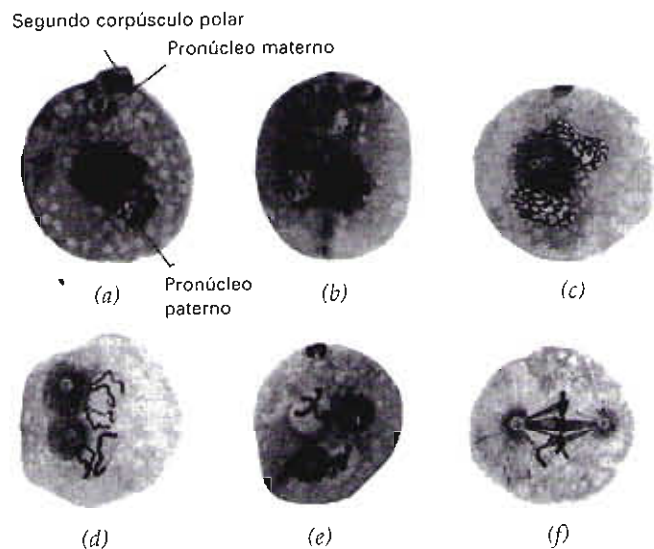


FIGURA 10-1. Hechos que ocurren en *Ascaris* luego de la fertilización, según se publicó en el siglo XIX como resultado de una investigación clásica. Tanto los gametos macho como hembra contienen dos cromosomas. La fusión del espermatozoide y del núcleo del óvulo (denominado pronúcleo) en el citoplasma del óvulo (entre e y f) produce un cigoto que contiene cuatro cromosomas. (Según T. Boveri, *Jenaische Zeit*, 22:685, 1888.)

terística más aparente es el núcleo y sus cromosomas. La importancia de los cromosomas aportados por el elemento masculino se manifestó en un estudio efectuado por el biólogo alemán Teodoro Boveri en huevos de erizo de mar fertilizados con dos espermatozoides en vez de uno, como normalmente es el caso. Esta condición, conocida como *polispermia*, se caracteriza por interrupción de la división de las células y muerte temprana del embrión. ¿Por qué un diminuto espermatozoide extra dentro del óvulo, de tamaño mucho mayor, tiene consecuencias tan drásticas? La presencia de un conjunto de cromosomas y un centríolo extras (pág. 337), ambos donados por el segundo espermatozoide, causa divisiones celulares anormales en el embrión, en las cuales las células hijas reciben cromosomas en número variable. Boveri concluyó que el desarrollo normal a través de un proceso ordenado “depende de una combinación particular de cromosomas; y esto sólo puede significar que los cromosomas individuales deben poseer cualidades diferentes”. Esta fue la primera demostración de una diferencia *cualitativa* entre los cromosomas, como sería de esperar si constituyeran un grupo de vehículos portadores de información genética.

El proceso subsecuente a la fertilización puede observarse con mayor detalle en el nematelminto *Ascaris*, cuyos pocos cromosomas son grandes y eran tan fáciles de observar en el siglo XIX como aún se hace en laboratorios para estudiantes de biología. En 1883, el biólogo belga Edouard van Beneden observó que las células del cuerpo del gusano poseían cuatro cromosomas grandes, pero los núcleos masculino y femenino presentes en el huevo justo después de la fertilización (antes de la fusión de los dos núcleos) sólo tenían dos cromosomas cada uno (fig. 10-1). Alrededor de 1880 se describió el proceso de la meiosis, y en 1887 el biólogo alemán August Weismann propuso que la meiosis incluye una “división reductora” durante la cual el número de cromosomas se divide a la mitad antes de la formación de los gametos. Si no ocurriera este tipo de división reductora, el número de cromosomas se duplicaría de una generación a la siguiente, lo cual evidentemente no puede ocurrir.

Cromosomas como portadores de información genética

El redescubrimiento del trabajo de Mendel y su confirmación tuvo influencia inmediata sobre la investigación en biología celular. Cualquiera que fuera su naturaleza física, los portadores de las unidades de herencia tendrían que comportarse de manera coherente con los principios mendelianos. En 1903, Walter Sutton, posgraduado de la Universidad de Columbia, publicó un artículo donde señaló directamente a los cromosomas como portadores físicos de los factores genéticos de Mendel. Sutton observó la formación de células en el espermatozoide del saltamontes, que igual que *Ascaris*, tiene cromosomas grandes y fáciles de observar. En las células germinales de la gónada masculina ocurren dos tipos de divisiones: divisiones mitóticas mediante las cuales las espermatogonias producen más espermatogonias, y divisiones meióticas durante las cuales la

espermatogonia produce espermatozoides. Examinando las etapas de la mitosis en la espermatogonia, Sutton contó 23 cromosomas. El examen atento de la forma y tamaño de los 23 cromosomas sugirió que se presentaban en pares “al parecer iguales”. Se distinguieron 11 pares de cromosomas junto con un cromosoma adicional, llamado *cromosoma accesorio* (posteriormente se demostró que era el cromosoma X determinante del sexo), que no tenía pareja. Sutton comprobó que la presencia de pares de cromosomas, o **cromosomas homólogos**, como pronto se les denominó, correlacionaba perfectamente con los pares de factores hereditarios descubiertos por Mendel.

Cuando Sutton examinó los cromosomas de células justo cuando iniciaban la meiosis, observó que los miembros de cada par de cromosomas se unían formando un *bivalente*. Identificó once bivalentes, cada uno mostrando una línea de asociación transversa (fig. 10-2). Cada una de las dos células resultantes de la primera división meiótica recibió uno de los cromosomas homólogos que este modo fueron separados. Esta era la división reductora propuesta 15 años antes por Weismann sobre bases puramente teóricas. También fue la base física de la proposición de Mendel acerca de la existencia de parejas de factores hereditarios que permanecen unidos durante toda la vida de un individuo, pero que se separan durante la formación de los gametos. La división reductora observada por Sutton explicó algunos otros hallazgos de Mendel: los gametos sólo contienen una versión de cada gen (alelo); el número de gametos que contiene cada alelo es igual al número de gametos con el alelo homólogo; y los dos gametos que se unen durante la fertilización producen un individuo con dos alelos para cada rasgo. Pero todavía persistieron muchas preguntas sin respuesta. Por ejemplo, ¿cómo se organizan los genes en los cromosomas? y ¿podría determinarse el sitio de genes específicos?

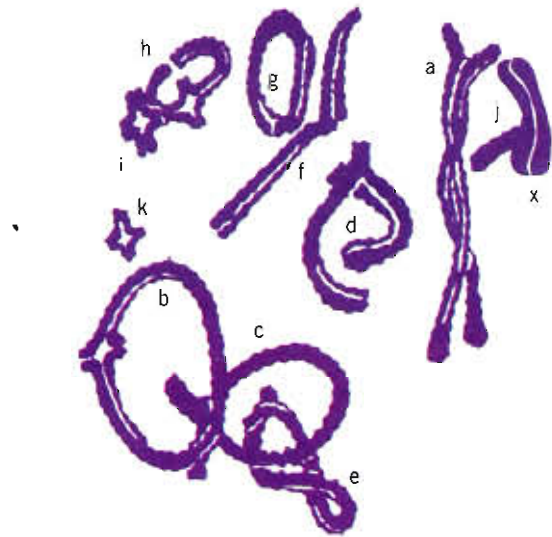


FIGURA 10-2. Cromosomas homólogos. Esquema de Sutton de los cromosomas homólogos del saltamontes macho reunidos durante la profase meiótica para formar bivalentes. Se observan 11 pares de cromosomas homólogos (a-k) y un cromosoma impar X. (Según W.S. Sutton, Biol. Bull 4:24, 1902.)

El cromosoma como grupo unido

Con la misma claridad que Sutton percibió la relación entre la conducta de los cromosomas y los resultados de Mendel en las plantas de guisante, también descubrió un problema deslumbrante. Mendel observó la herencia de siete rasgos y encontró que cada uno se heredaba de manera independiente respecto de los otros. Esta fue la base de la Ley de la permutación independiente de Mendel. Pero si los genes permanecían unidos dentro de los cromosomas, igual que las cuentas de un rosario, entonces un progenitor debía pasar cromosomas enteros a su descendencia, o sea, paquetes de genes. Los genes sobre un mismo cromosoma deben actuar como si estuvieran *vinculados* entre sí; o sea, formar parte de un mismo **grupo unido**.

¿Cómo fue que los siete rasgos de Mendel se permutaron de manera independiente? ¿Se encontraban todos sobre diferentes grupos unidos, o sea, diferentes cromosomas? Si este es el caso, el guisante de jardín debe poseer siete pares diferentes de cromosomas homólogos. Los genes que controlan cada rasgo estudiado por Mendel pueden encontrarse en cromosomas diferentes o estar tan separados sobre el mismo cromosoma que pueden actuar de manera independiente (página 393). Si los resultados de Mendel se debieron exclusivamente a la buena suerte o sólo a falta de interés en cualquier rasgo que no concordara con sus predicciones, esto todavía no está claro.

La predicción de Sutton acerca de grupos enlazados pronto se transformó de especulación en un hecho. Antes de dos años se demostró en los chícharos dulces que dos rasgos (color de las flores y forma del polen) estaban ligados, y rápidamente se acumularon otros datos de la unión cromosómica.

Análisis genético en *Drosophila*

Pronto la investigación en genética se enfocó sobre un organismo, la mosca de la fruta *Drosophila* (fig. 10-3). El plazo para el desarrollo de una mosca de la fruta (del huevo a la madurez) es de 14 días y tiene capacidad para producir hasta 1 000 huevos en el curso de su existencia. Además, es un animal muy pequeño, de modo que se puede manejar un gran número de estos insectos; son fáciles de conservar y alimentar y muy poco costosos. En 1909, Thomas Hunt Morgan, de la Universidad de Columbia, lo consideró el organismo perfecto e inició lo que después fue el principio de una nueva era en investigación genética. Cuando comenzó a trabajar con este insecto tuvo una gran desventaja: sólo disponía de una "cepa" de mosca, el *tipo silvestre* (fig. 10-3). Mendel simplemente tuvo que comprar algunas variedades de semillas de guisante, pero Morgan debió generar sus propias variedades de mosca de la fruta. Esperaba que podían surgir variantes del tipo silvestre si criaba moscas en número suficiente. Antes de un año y después de criar miles de moscas logró su primer **mutante**, o sea, un individuo con una característica hereditaria que lo diferenciaba del tipo silvestre. El mutante poseía ojos blancos en vez de los normales de color rojo.

Alrededor de 1915, Morgan y sus estudiantes habían encontrado 85 mutantes diferentes con gran variedad de



FIGURA 10-3. Mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. Fotografía de mosca de la fruta de tipo silvestre, macho y hembra. (Según R. Calentine/Visuals Unlimited.)

estructuras afectadas. Al parecer, en raras ocasiones ocurría un cambio espontáneo, o **mutación**, dentro de un gen, que se alteraba de manera permanente y podía transmitirse de una generación a la siguiente. Demostrar que una alteración espontánea en un gen se heredaba tuvo consecuencias mucho más trascendentes que la genética de *Drosophila*. La comprobación del origen de las variaciones que aparecen en las poblaciones fue la prueba de un eslabón vital en la teoría de la evolución. Si podían originarse nuevos genes de esta manera, entonces la selección natural podía actuar sobre los mutantes y así, lentamente, surgirían nuevas especies. Las mutaciones genéticas suministran la materia prima requerida para la mutabilidad de las especies.

Las mutaciones constituyen un acontecimiento necesario para la evolución, pero también son una herramienta para los genetistas, un signo contra el cual se puede comparar la condición de silvestre. Conforme se aislaron las mutantes de *Drosophila*, fueron criadas, cruzadas y mantenidas como reserva en el laboratorio. Tal como se esperaba, las 85 mutaciones no se permutaron de manera independiente; en vez de eso, Morgan encontró que pertenecían a cuatro diferentes grupos ligados, uno con muy pocos genes mutantes (sólo dos en 1915). Este dato se relaciona perfectamente con la observación de que las células de *Drosophila* poseen cuatro pares de cromosomas homólogos, uno muy pequeño (fig. 10-4). Persistieron muy pocas dudas acerca de que los genes residen en los cromosomas.

Entrecruzamiento y recombinación

Aunque se confirmó la asociación de genes en grupos ligados, el vínculo entre alelos sobre el mismo cromosoma era *incompleto*; o sea, alelos originalmente presentes sobre de-

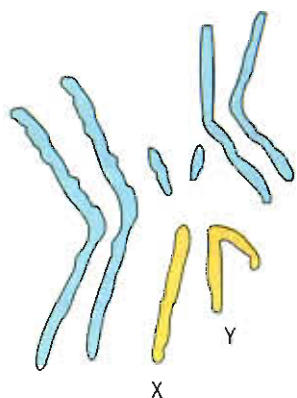


FIGURA 10-4. La mosca de la fruta posee cuatro cromosomas, uno muy pequeño. Los dos cromosomas homólogos distintos determinan el sexo. Igual que en el hombre, la mosca de la fruta macho es XY y la hembra XX.

terminado cromosoma no permanecen juntos por obligación durante la formación de los gametos. Por lo tanto, las características maternas y paternas heredadas por un individuo en cromosomas homólogos separados pueden “barajarse”, de modo que determinados cromosomas en el gameto pueden contener alelos originalmente derivados de progenitores separados.

En 1911, Morgan ofreció una explicación de la descomposición de la unión. Dos años antes, F.A. Janssens observó que cromosomas homólogos de los bivalentes se entrelazaban en la etapa temprana de la meiosis (fig. 10-5). Janssens propuso que esta interacción entre cromosomas maternos y paternos podía provocar la descomposición e intercambio de fragmentos. Aprovechando esta observación y la proposición de Janssens, Morgan sugirió que este fenómeno, al cual denominó **entrecruzamiento** (o **recombinación genética**), podía explicar la aparición de descendientes (*recombinantes*) que mostraban combinaciones inesperadas de rasgos genéticos. En la figura 10-6 se muestra un ejemplo de entrecruzamiento.

El estudio de los descendientes de un gran número de cruzamientos entre adultos portadores de varias mutaciones sobre un mismo cromosoma mostró: 1) que el porcentaje de recombinación entre determinado par de genes de un cromosoma, como color de ojos y longitud de alas, era constante de un experimento a otro, y 2) que los porcentajes de recombinación entre distintos pares de genes, como entre color de ojos y longitud de las alas en comparación con color de ojos y color del cuerpo, podían ser muy diferentes.

El hecho de que determinado par de genes muestre la misma frecuencia de recombinación en todos los cruzamientos sugiere fuertemente que la posición de los genes a lo largo del cromosoma (su **locus**) es fijo y no varía de una mosca a la siguiente. Si cada gen tiene un locus fijo, entonces la frecuencia de recombinación entre dos genes debe reflejar la distancia que separa dichos genes. Cuanto mayor sea el espacio disponible entre dos sitios del cromosoma, más probable será que ocurra rompimiento entre esos dos sitios y mayor la frecuencia de recombinación. El ejemplo ilustrado en la figura 10-6 muestra que los genes de *Drosophila* para longitud de alas y color del cuerpo se sitúan a una



FIGURA 10-5. Visualización de los sitios de entrecruzamiento. Cromosomas homólogos se entrelazan durante la meiosis, como se observa en esta micrografía de las células meióticas de un lirio. Los puntos donde se cruzan los homólogos se denominan *quiasmas* (flechas) y (como se analiza en el capítulo 14) son sitios donde ocurre el entrecruzamiento en etapa más temprana. (Cortesía de A.H. Sparrow.)

distancia considerable sobre el cromosoma y, por lo tanto, es probable que se encuentren separados por un punto de desintegración interpuesto. En contraste, los genes para color de ojos y color del cuerpo están muy cerca uno del otro sobre el cromosoma, y por consiguiente generan un porcentaje mucho menor de descendientes recombinantes.

Alelos localizados en extremos opuestos de un largo cromosoma quedan tan separados que con frecuencia se comportan como si estuvieran localizados en cromosomas separados. Mediante la frecuencia de recombinación, los genetistas pudieron preparar mapas detallados de series de genes ordenados a lo largo de cada uno de los cuatro cromosomas de la mosca de la fruta. Desde entonces se emplean las frecuencias de recombinación para preparar mapas cromosómicos de diversos organismos, desde virus y bacterias hasta una gran variedad de especies de eucariotes.

Mutagénesis y cromosomas gigantes

En la primera etapa de la genética, la búsqueda de mutantes era un procedimiento lento y tedioso dependiente de la aparición *espontánea* de genes alterados. Utilizando una cepa especial de mosca de la fruta diseñada para revelar la presencia de alelos recesivos, Herman Muller, de la Universidad de Indiana, observó que las moscas sometidas a una dosis subletal de rayos X mostraban una frecuencia 100 veces mayor de mutación espontánea. Este dato tuvo consecuencias importantes. En la práctica, el empleo de agentes mutá-

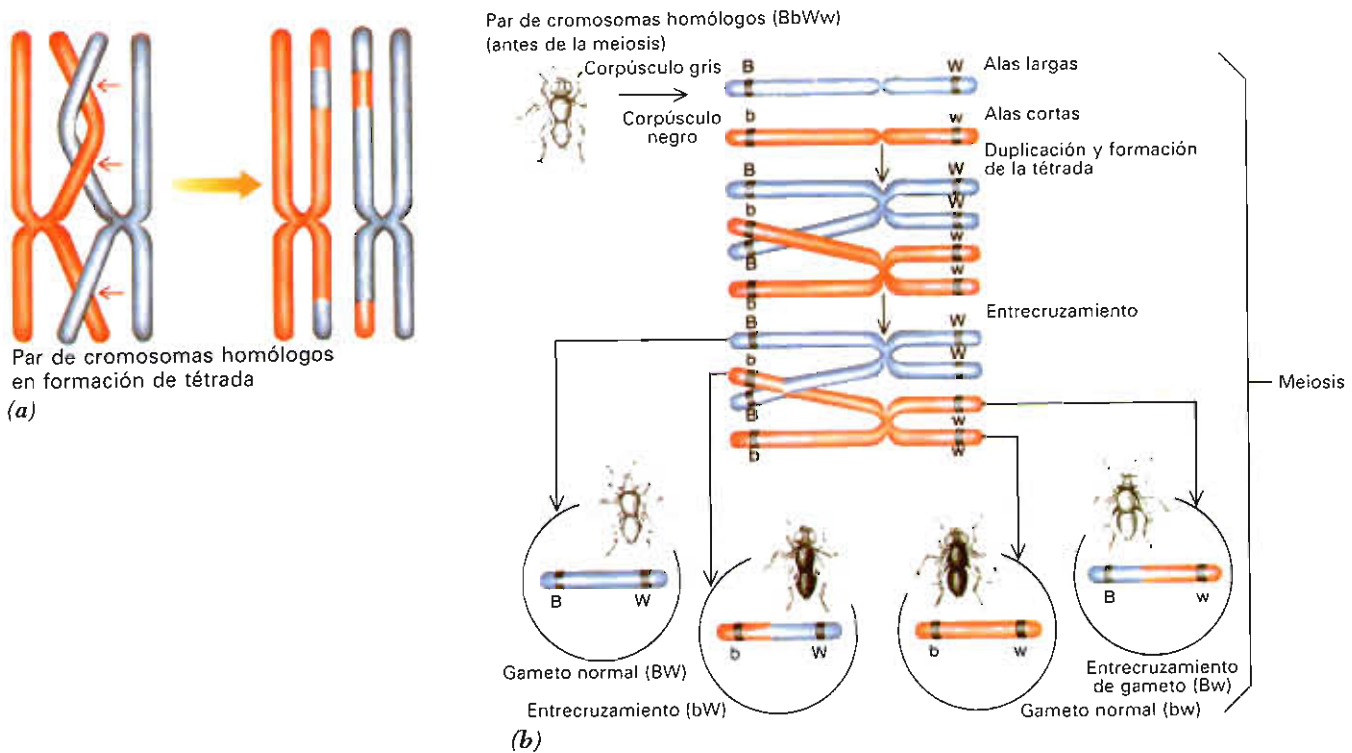


FIGURA 10-6. El entrecruzamiento proporciona el mecanismo para “barajar” los alelos de los cromosomas materno y paterno. a) Formación bivalente (tétrada) durante la meiosis, mostrando las tres posibles intersecciones del entrecruzamiento (quiasmas, indicados por flechas rojas). b) Representación simplificada de un entrecruzamiento sencillo en un heterocigoto de *Drosophila* (BbWw) en el cromosoma número 2 y los gametos resultantes. Si alguno de los gametos entrecruzados participa en la fertilización, la descendencia presentará una combinación de alelos ausente en los progenitores.

genos, como rayos X y radiación ultravioleta, incrementó mucho el número de mutantes disponibles para la investigación genética. Esto también mostró el peligro de incrementar el empleo de radiaciones en la industria y la medicina. Además, reveló una nueva propiedad importante del material genético: cualquiera que fuera su naturaleza química, era susceptible de sufrir alteraciones por radiación electromagnética.

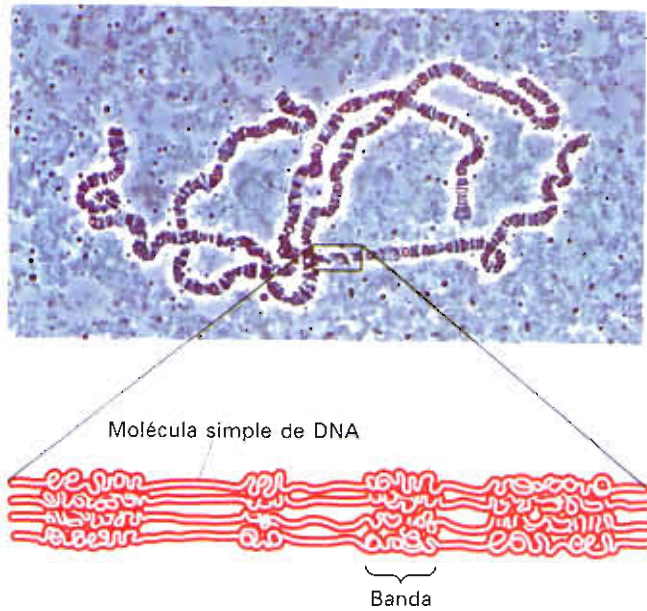
El redescubrimiento de los cromosomas gigantes de ciertas células de insectos, efectuado en 1933 por Theophilus Painter, de la Universidad de Texas, ilustra una característica básica de los sistemas biológicos. Hay variabilidad tan notable entre los organismos, demostrable no sólo a nivel macroscópico sino también celular y subcelular, que con frecuencia un tipo particular de célula puede ser mucho más adecuado para cierto tipo de investigación en comparación con todos los demás.

Las células de la glándula salival de la larva *Drosophila* contienen cromosomas casi 100 veces más grandes que los observados en la mayor parte de las otras células del organismo (fig. 10-7, a). Durante el desarrollo de la larva, estas células interrumpen su división pero mantienen su crecimiento. La duplicación del DNA continúa y suministra el material genético adicional necesario para apoyar el elevado nivel de actividad secretoria de estas enormes células. Las cadenas duplicadas de DNA permanecen fijas entre sí en perfecta alineación lado con lado (recuadro de la figura

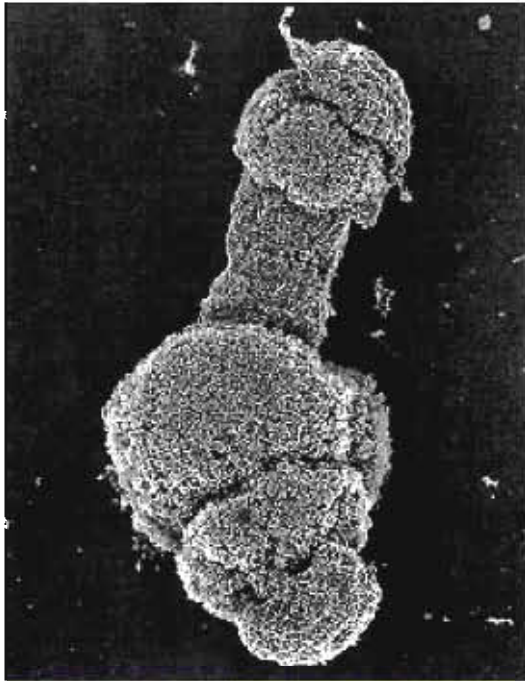
10.7, a), produciendo cromosomas gigantes hasta con 1 024 veces más cadenas de DNA en comparación con los cromosomas normales.

Estos **cromosomas politeno**, como se les denomina, son ricos en detalles visuales, y cuando se les tiñe y examina al microscopio muestran casi 5 000 bandas. Lo más importante es que el patrón de bandas prácticamente es constante de una mosca a otra y de un tejido a otro; en contraste, se pueden observar diferencias considerables entre los cromosomas de moscas de diferentes especies del género *Drosophila*. Painter notó que ciertas bandas individuales podían correlacionarse con genes específicos. La posición relativa de los genes sobre los cromosomas gigantes concuerda con la posición pronosticada en mapas genéticos preparados según la frecuencia de recombinación, lo que confirma visualmente la validez de todo el procedimiento de mapeo.

Los cromosomas gigantes de los insectos también son útiles por otra razón. Comparando los patrones de bandas de cromosomas politeno de diferentes especies se tiene la oportunidad sin paralelo de investigar cambios evolutivos a nivel de cromosoma. Además, estos cromosomas no son objetos celulares inertes, sino estructuras dinámicas en las cuales ciertas regiones se “esponjan” durante etapas particulares del desarrollo (fig. 10-7, b). Los cromosomas esponjados son sitios donde se transcribe DNA a RNA y suministran uno de los mejores sistemas disponibles para visualizar directamente la expresión de genes (fig. 17-20, a).



(a)



(b)

FIGURA 10-7. Cromosomas politeno gigantes de larvas de insecto. *a)* Estos cromosomas politeno gigantes de la glándula salival de una larva de mosca de la fruta muestran miles de bandas distintas teñidas en color oscuro. Muchas de las bandas se han identificado como loci de genes particulares. En este insecto, los cromosomas politeno constan de varias cadenas individuales de DNA. Las bandas sobre los cromosomas corresponden a sitios donde el DNA está más firmemente compactado. *b)* Gammagrafía electrónica de un cromosoma politeno gigante procedente de una larva de *Chironomus* mostrando la expansión de sitios específicos para formar una "esponja". Los cromosomas esponjados son sitios donde se transcribe DNA. (*a:* Según Biological Photo Service; *b:* cortesía de Terry D. Allen y Claus Pelling.)

10-2 Naturaleza química del gen

Los genetistas clásicos descubrieron las reglas que gobiernan la transmisión de características genéticas y la relación entre genes y cromosomas. En 1934, en su discurso de aceptación del Premio Nobel, T. H. Morgan afirmó que "al nivel en que se encuentran los experimentos de genética no hay diferencia alguna si el gen es una unidad hipotética o una partícula material". Sin embargo, en el decenio de 1940 se plantearon nuevas preguntas, y la más importante fue la siguiente: ¿Cuál es la naturaleza química del gen? Los experimentos que condujeron a responder esta pregunta se presentan en *La vía experimental* de este capítulo. Por ahora consideraremos algo de la información reunida cuando se demostró que los genes estaban constituidos por DNA.

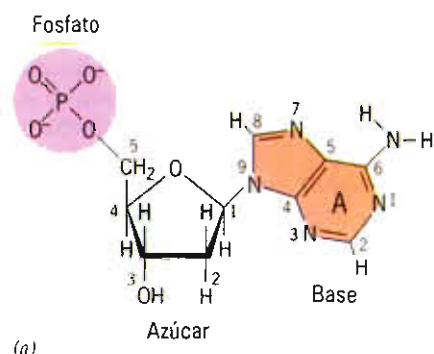
Estructura del DNA

En 1952, la comunidad científica finalmente aceptó la idea de que los genes estaban constituidos por DNA. El descubrimiento de que el material genético era DNA dio respuesta a una pregunta de suma importancia, pero no ayudó gran cosa a explicar cómo funciona una molécula de DNA dentro de la célula. Para comprender las funciones de una macromolécula compleja, sea proteína, polisacárido, lípido o ácido nucleico, es indispensable conocer cómo está construida dicha molécula. A principios del decenio de 1950, en varios laboratorios de Estados Unidos y de Inglaterra se investigaba el enigma de la estructura del DNA; el problema fue resuelto en 1953 por James Watson y Francis Crick, de la Universidad de Cambridge. Antes de describir la estructura propuesta consideraremos los hechos disponibles en aquel tiempo. La información acerca de la estructura del DNA se derivó de estudios de dispersión bioquímica iniciados por Friedrich Miescher en 1860 y por análisis de difracción de rayos X llevados a cabo por William Astbury en el decenio de 1940 y continuados por Rosalind Franklin, Linus Pauling, Maurice Wilkins y otros.

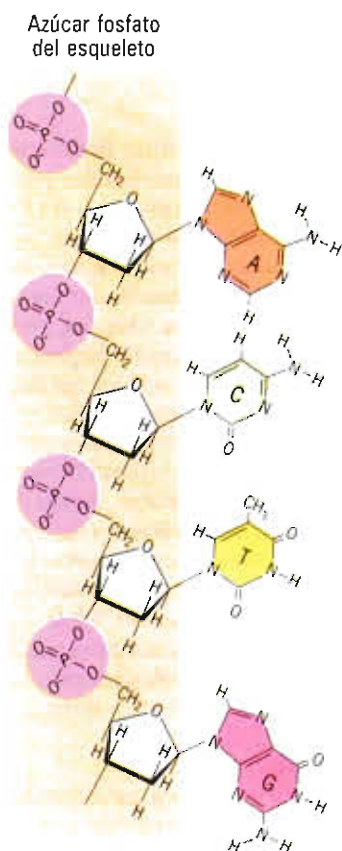
Composición de las bases

Se sabía que la unidad básica para construir DNA era un nucleótido (fig. 10-8, *a*), constituido por un azúcar desoxirribosa de cinco carbonos al cual se fijaba un fosfato esterificado en la posición 5' del anillo de azúcar, y en el sitio 1' una base nitrogenada.¹ Hay dos tipos de bases, las piri-

¹ En este punto es útil introducir un poco de terminología. Una molécula que sólo contiene una de las cuatro bases nitrogenadas de la figura 10-8 unida a una fracción de azúcar pentosa se conoce como *nucleósido*. Si el azúcar es una desoxirribosa, el nucleósido es un *desoxirribonucleósido*. Son cuatro los principales desoxirribonucleósidos según la base unida: desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina y desoxicitidina. Si el nucleósido posee uno o más grupos fosfato unidos (generalmente en la posición 5'), la molécula es un *nucleótido*. Hay nucleósidos 5'-monofosfato, nucleósidos 5'-difosfato y nucleósidos 5'-trifosfato, según el número de fosfatos en la molécula. Ejemplos de cada uno son la desoxiadenosina 5'-monofosfato (dAMP), desoxiguanosina 5'-difosfato (dGDP) y desoxicitidina 5'-trifosfato (dCTP). Un conjunto similar de nucleótidos implicados en el metabolismo del RNA contienen el azúcar ribosa en vez de desoxirribosa. Nucleótidos como el ATP utilizados en el metabolismo energético son moléculas que contienen ribosa.



(a)



(b)

FIGURA 10-8. Estructura química del DNA. a) Estructura de un nucleótido. El nucleótido aquí mostrado contiene la base adenosina; la molécula es una desoxiadenosina 5'-monofosfato (dAMP). b) Estructura química de un pequeño segmento de una cadena de DNA simple mostrando los cuatro nucleótidos.

midinas más pequeñas y las purinas de mayor tamaño. También se sabía que los nucleótidos se unen entre sí mediante enlaces covalentes para formar un polímero lineal, o *cadena*, con un eje central compuesto por grupos alternos de azúcar y fosfato unidos por enlaces 3',5'-fosfodiéster (fig. 10-8, b). Se pensaba que las bases fijas a cada azúcar se proyectan desde el esqueleto central como una columna de entrepaños apilados.

Los nucleótidos poseen una estructura polarizada: un borde denominado *extremo 5'* donde se localiza el fosfato y

otro borde llamado *extremo 3'* (fig. 10-8, a). Puesto que todos los nucleótidos apilados de la cadena miran hacia el mismo lado, toda la cadena tiene una dirección. Un extremo es el 3' y otro el 5' (fig. 10-8, b). El análisis de difracción de rayos X indica que la distancia entre los nucleótidos apilados es de 3.4 Å (0.34 nm) y sugiere la presencia de una estructura grande repetida cada 3.4 nm. La pregunta de mayor importancia es cómo se organizan las cadenas de la molécula.

Como se analiza en la página 426, el concepto inicial de DNA como simple tetranucleótido repetido (p. ej.: —ATGCATGCATGC—) impidió que se le considerara como macromolécula portadora de información. En 1950, Erwin Chargaff, de la Universidad de Columbia, hizo un importante descubrimiento que excluyó finalmente la teoría del tetranucleótido y proporcionó información vital a Watson y Crick. Chargaff, convencido de la importancia clave de la secuencia de nucleótidos del DNA, inició el primer paso en todo análisis de secuencia: determinó la cantidad relativa de cada base en muestras de DNA. El análisis de **composición de bases** se efectuó por hidrólisis de las bases fijas a los azúcares, aislando las bases del hidrolizado mediante cromatografía en papel y determinando la cantidad de material en cada uno de los cuatro puntos a los cuales se desplazaron las cuatro bases.

Si la teoría del tetranucleótido era correcta la proporción de cada base debe ser casi 25% de la cantidad total. Chargaff encontró que la proporción de las cuatro bases componentes era muy variable de un tipo de organismo a otro y con frecuencia muy diferente de la proporción 1:1:1:1 pronosticada por la teoría del tetranucleótido. Por ejemplo, la proporción A:G del DNA del bacilo tuberculoso era 0.4, en tanto que la proporción A:G del DNA humano era 1.56. La composición de bases permanecía constante en dichas especies sin que el tejido empleado como fuente de DNA hiciera diferencia alguna. Dentro de esta gran variabilidad en las bases que componen diferentes DNA se descubrió una importante relación numérica. En una muestra determinada de DNA, el número de purinas siempre es igual al número de pirimidinas. Más específicamente, el número de adeninas siempre igualó al número de timinas, y el número de guaninas siempre fue igual al de citosinas. En otras palabras, Chargaff descubrió las siguientes reglas en la composición de bases del DNA:

$$[A] = [T] \quad [G] = [C] \quad [A] + [T] \neq [G] + [C]$$

Los datos de Chargaff arrojaron nueva luz sobre la molécula de DNA confiriéndole especificidad e individualidad de un organismo a otro. Sin embargo, el significado de la equivalencia de bases todavía no está claro.

La proposición de Watson y Crick

Cuando analizamos la estructura de las proteínas en el capítulo 2, subrayamos la importancia de las estructuras secundaria y terciaria como determinantes de la actividad de la proteína. Para comprender la actividad biológica del DNA se requiere información similar acerca de su organización tridimensional. Mediante datos de difracción de rayos X y la construcción de modelos factibles a partir de cortes de los

cuatro tipos de nucleótidos, Watson y Crick propusieron un modelo de la estructura del DNA que incluye los siguientes elementos (fig. 10-9):

1. La molécula se compone de dos cadenas de nucleótidos. Esta proposición fue seguida casi de inmediato por una propuesta errónea de Linus Pauling, quien sugirió que el DNA se compone de tres cadenas de nucleótidos.
2. Las dos cadenas se enrollan alrededor de un eje central formando un par de hélices derechas. Las hélices derechas avanzan girando en dirección de las manecillas del reloj. La naturaleza helicoidal del DNA fue revelada por un patrón de puntos producido por difracción de rayos X.
3. El esqueleto -azúcar-fosfato-azúcar-fosfato- se localiza en el exterior de la molécula con los dos grupos de bases proyectándose hacia el centro. En el modelo de Pauling, el esqueleto de cada cadena se situó equivocadamente en el centro de la molécula. Los grupos fosfato confieren a la molécula carga negativa.
4. Las bases ocupan planos aproximadamente perpendiculares al eje longitudinal de la molécula y por lo tanto se colocan una sobre otra igual que platos apilados. Las interacciones hidrofobas y las fuerzas de van der Waals (pág. 35) entre las bases planares apiladas estabilizan toda la molécula del DNA. Las vueltas helicoidales y los pares de bases planares, en conjunto, confieren a la molécula el aspecto de una escalera de caracol.
5. Las dos cadenas se conservan unidas mediante puentes de hidrógeno entre las bases de una cadena y sus correspondientes bases sobre la otra cadena. Un puente de hidrógeno, por sí solo, es débil y fácil de romper, lo que permite la separación de las cadenas de DNA durante ciertas actividades. Al mismo tiempo, la fuerza de los puentes de hidrógeno es aditiva, de modo que el gran número de ellos que mantiene las cadenas juntas confiere estabilidad a la doble hélice de la molécula.
6. La distancia del átomo de fósforo del esqueleto al centro del eje es de 10 Å (por lo tanto, la anchura de la doble hélice es de 20 Å).
7. La pirimidina de una cadena siempre coincide con una purina de la otra cadena. Esta relación genera una molécula de 20 Å de ancho. Por lo contrario, la asociación de dos purinas podría extenderse más allá de la anchura especificada, y la asociación de dos pirimidinas podría no ser suficientemente ancha.
8. Los átomos de nitrógeno unidos al carbono 4 de la citosina y al carbono 6 de la adenina muestran predominantemente la configuración amino (NH_2) (fig. 10-9) y no la forma imino (NH). De manera similar, los átomos de oxígeno enlazados al carbono 6 de la guanina y al carbono 4 de la timina predominantemente muestran configuración ceto ($\text{C}=\text{O}$) en vez de configuración enol ($\text{C}-\text{OH}$). Estas restricciones estructurales en la configuración de las bases sugieren que la única purina estructuralmente capaz de enlazarse a timina es adenina y que guanina es la única purina capaz de enlazarse a citosina. Por lo tanto, los únicos pares posibles fueron A-T y G-C, que satisfacen perfectamente el análisis pre-

vio de la composición de bases efectuado por Chargaff. Los pares A-T se unen mediante dos puentes de hidrógeno y los pares G-C mediante tres puentes de hidrógeno.

9. Las dos cadenas que componen una doble hélice corren en direcciones opuestas; o sea, son *antiparalelas*. Por lo tanto, si una cadena se encuentra alineada en la dirección 5'3'. Al observar la molécula desde el exterior se nota que en el espacio entre vueltas adyacentes de la hélice se forman dos surcos de diferente amplitud: un *surco mayor* más ancho y un *surco menor* más estrecho, que rodean en espiral la superficie externa de la doble hélice. Las proteínas unidas al DNA casi siempre se alojan en estos surcos.
11. La doble hélice efectúa una vuelta completa cada 10 residuos (3.4 nm), o 150 vueltas por cada fragmento igual a un millón de veces el peso molecular.
12. No hay restricción alguna sobre la secuencia de bases de determinada cadena de la molécula. Sin embargo, una vez especificada la secuencia particular de una cadena automáticamente queda determinada la secuencia de la otra cadena. Esta relación entre las dos cadenas de la doble hélice se conoce como **complementariedad**. Por ejemplo, A es complementaria de T, AGC es complementaria de TCG, y una cadena completa es complementaria de la otra. Como veremos después, la complementariedad es de suma importancia para casi toda actividad y mecanismo donde participan ácidos nucleicos.

Importancia de la proposición de Watson-Crick

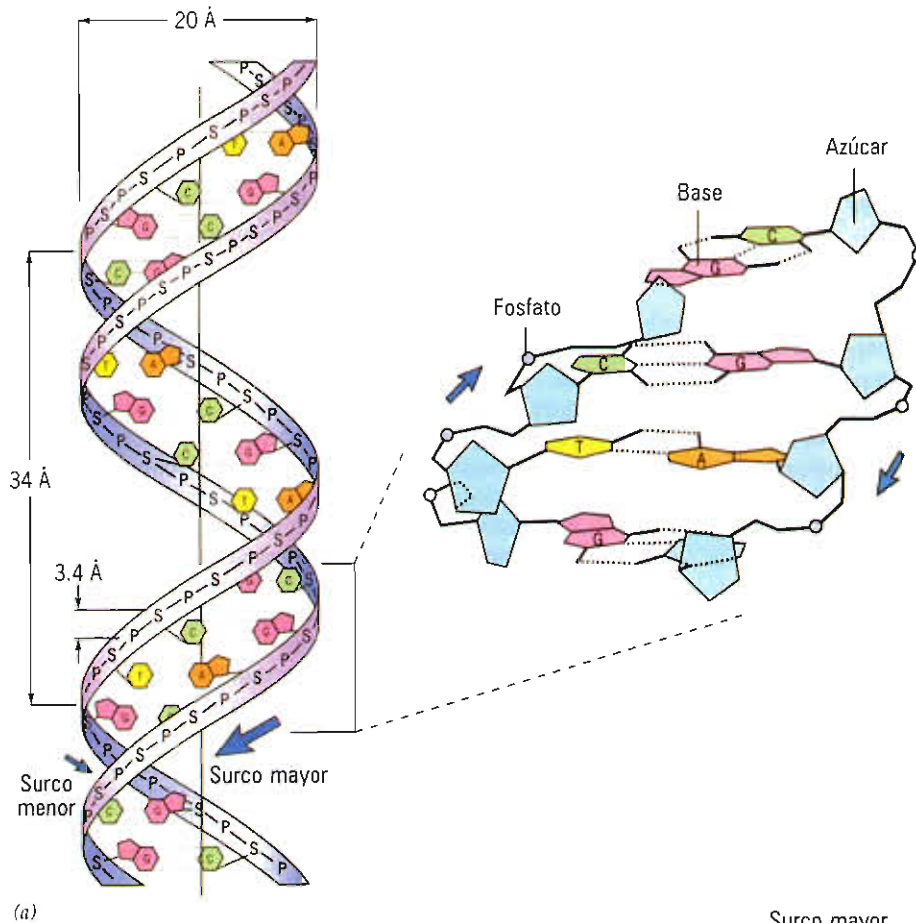
Desde la primera vez que los biólogos consideraron al DNA como material genético, definieron tres principales funciones que debía cumplir (fig. 10-10):

1. **Almacén de información genética.** El DNA es la "plantilla" molecular, un registro de instrucciones precisas almacenadas que definen todas las características hereditarias mostradas por un organismo.

2. **Autoduplicación y herencia.** Puesto que el DNA contiene toda la plantilla de un organismo, debe contener la información para su propia *duplicación*. La duplicación del DNA es el medio para transmitir instrucciones genéticas de una célula a sus células hijas o de un individuo a su descendencia.

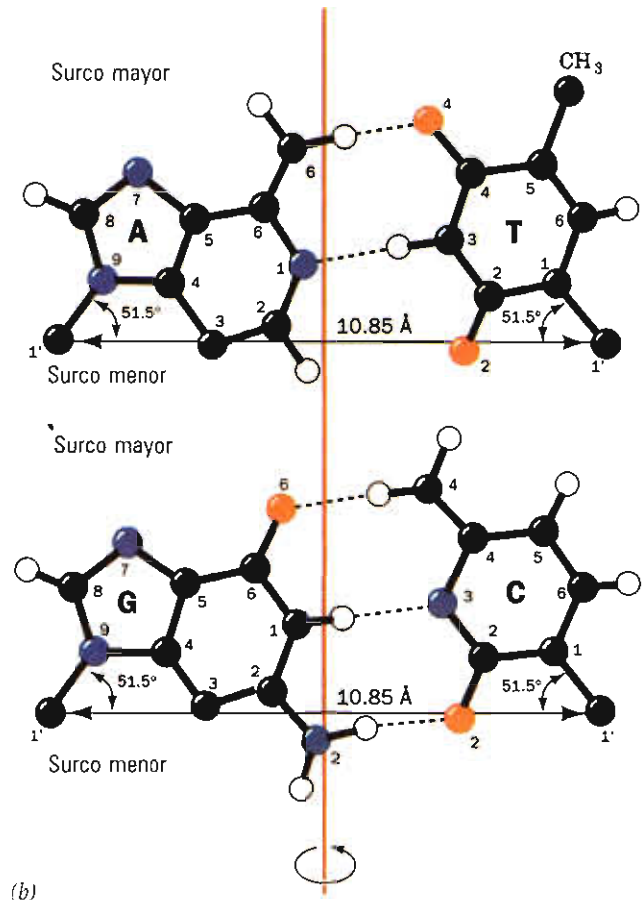
3. **Expresión del mensaje genético.** Durante muchos años los biólogos sospecharon que los genes individuales transportan información para sintetizar proteínas específicas. Debía existir algún mecanismo para utilizar la información almacenada en un gen en la síntesis de polipéptidos específicos.

El modelo de la estructura del DNA propuesto por Watson-Crick fue de suma importancia para averiguar de qué manera se efectúan las dos primeras de estas tres funciones genéticas. El modelo apoyó fuertemente la sospecha de que el contenido de información del DNA reside en la secuencia lineal de las bases. A cada gen corresponde determinado segmento de DNA. La secuencia específica de nucleótidos en dicho segmento dictaría la secuencia de aminoácidos en



(a)

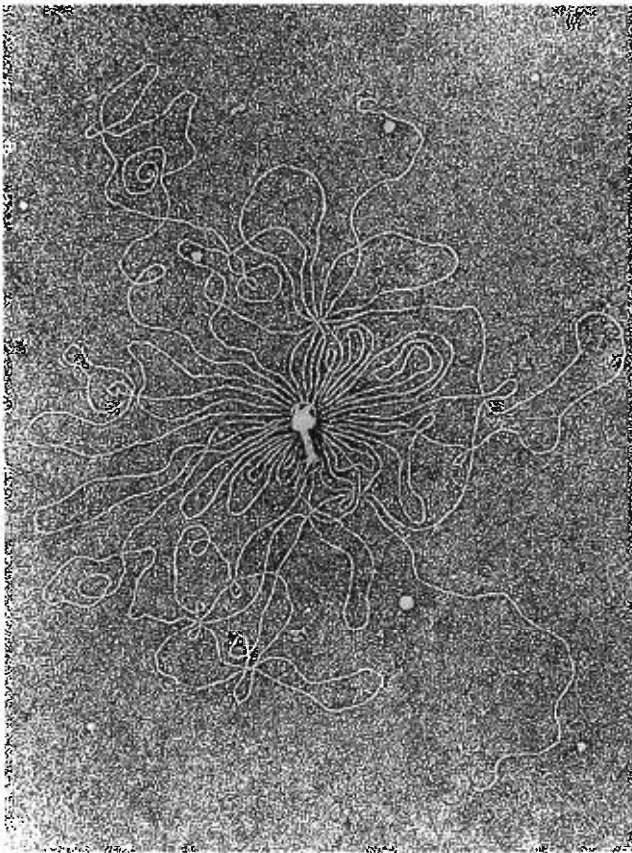
FIGURA 10-9. La doble hélice. a) Representación esquemática de la doble hélice de DNA. b) El par de bases de Watson y Crick. c) Modelo de espacio lleno de la forma B de DNA mostrando cómo las bases llenan el espacio entre los dos esqueletos. (El tamaño de los átomos incluye su radio de van der Waals.) d) Micrografía electrónica del DNA liberado de la cabeza rota del bacteriófago T2. Esta molécula de DNA lineal (nótese los dos extremos libres) tiene un peso molecular de casi 1.2×10^8 daltons (180 000 pares de bases) y mide $68 \mu\text{m}$ de longitud, unas 600 veces más largo que la cabeza del fago en la cual está contenida. (c: Cortesía de Nelson Max; d: cortesía de A.K. Kleinschmidt y cols. *Biochim. Biophys. Acta* 61:861, 1962.)



(b)



(c)



(d)

FIGURA 10-9. (Continuación.)

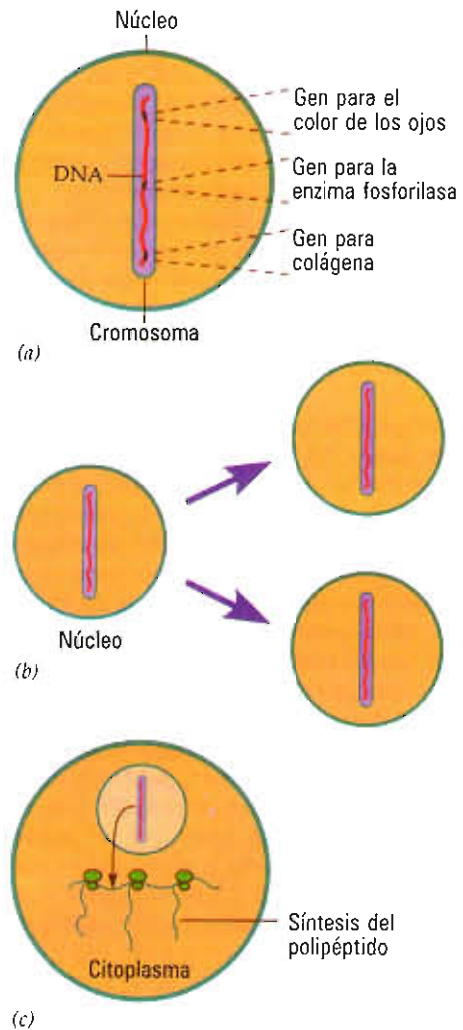


FIGURA 10-10. Tres funciones requeridas del material genético.

a) El DNA debe contener la información que codifica estos rasgos hereditarios. b) El DNA debe contener información para controlar su propia duplicación. c) El DNA debe contener información para controlar el ensamblado de proteínas específicas.

el polipéptido correspondiente. Un cambio de la secuencia lineal de los nucleótidos de dicho segmento provocaría una mutación hereditaria en dicho gen.

Respecto de la segunda función, la publicación inicial de Watson y Crick acerca de la estructura del DNA incluyó una propuesta de la manera como se puede duplicar una molécula. Sugirieron que durante la duplicación los puentes de hidrógeno que mantienen unidas a las dos cadenas de la hélice de DNA se rompían secuencialmente provocando una separación gradual de las cadenas, muy parecido a lo que ocurre en las dos mitades de un cierre automático empleado en prendas de vestir. Cada cadena separada, con sus bases nitrogenadas expuestas, serviría entonces como *plantilla*, dirigiendo el orden de ensamblado de nucleótidos complementarios para formar las cadenas complementarias. Al concluir este proceso se generan dos moléculas idénticas de una doble cadena de DNA, cada una con una cadena de

la molécula DNA original y una cadena recién sintetizada (fig. 13-1). En el capítulo 13 estudiaremos qué tan acertada fue la propuesta de Watson y Crick y su predicción del mecanismo de duplicación del DNA. De las tres funciones primarias mencionadas antes, sólo el mecanismo de control del ensamblado de DNA para formar una proteína específica permaneció en el más absoluto misterio.

La dilucidación de la estructura del DNA no sólo fue importante en sí misma, sino que también estimuló la investigación de toda actividad donde debía participar material genético. Una vez aceptado el modelo estructural, toda teoría del código genético, síntesis de DNA, o transferencia de información debía concordar con dicha estructura.

Conformaciones alternativas del DNA

Los datos de difracción de rayos X empleados por Watson y Crick provenían del análisis de preparaciones de fibras de DNA en estado hidratado. Esta forma totalmente hidratada o "húmeda" del DNA, descubierta por Rosalind Franklin, se denomina *forma B* y al parecer representa la conformación de la molécula como existe dentro de la célula. Franklin observó que fibras preparadas bajo condiciones de escasa humedad mostraban estructura más cristalina y sus patrones de difracción de rayos X presentaban contrastes más agudos. En las fibras más secas, la conformación de las moléculas de DNA es algo diferente a la de fibras más hidratadas y se conoce como *forma A* del DNA. La transición de la forma B a la forma A se acompaña de gran número de cambios en la molécula (fig. 10-11, *a* y *b*), incluyendo un notable acortamiento de toda la fibra, cambio en la pendiente de la hélice de 3.4 a 2.7 Å de elevación por cada par de bases, inclinación de las bases respecto del eje de la hélice,

etcétera. Estudios subsecuentes indicaron que la forma A del DNA presenta conformación similar a la que adoptan las regiones de doble cadena en las moléculas de RNA.

En realidad, las formas A y B son muy similares entre sí; ambas son hélices con vueltas de cuerda a la derecha. En 1978, Alexander Rich y sus colegas, del Massachusetts Institute of Technology, estudiaban patrones de difracción de rayos X en cristales de un DNA sintético que sólo contenía pares de bases G-C. El patrón de difracción reveló un DNA de forma helicoidal nunca antes observado. A diferencia de todos los DNA estudiados previamente, las cadenas de esta molécula sintética se enrollaban en una espiral de sentido retrógrado, una hélice con giro a la izquierda. También la conformación del esqueleto estructural de esta hélice era muy diferente, con un trayecto continuo en zigzag en vez de uno regular como la forma B (fig. 10-11, *e*). Rich denominó **DNA-Z** a esta nueva estructura del DNA.

La pregunta de mayor importancia respecto del DNA-Z es si existe o no *in vivo*, y si la respuesta es afirmativa, qué papel desempeña. Las pruebas que apoyan la presencia del DNA-Z en las células se han debatido calurosamente. Estudios *in vitro* del DNA-Z sugieren que sólo es estable en condiciones no fisiológicas, como en concentración salina elevada o de torsión forzada; en condiciones fisiológicas, la conformación *in vitro* se transforma en una hélice con giro a la derecha. La posibilidad de que el DNA cromosómico pudiera existir en más de una conformación tiene importantes implicaciones, puesto que añade una nueva dimensión a la estructura del material genético relacionada con el esqueleto estructural y no con la secuencia de nucleótidos. Todavía falta establecer si hay condiciones locales en una porción del cromosoma que pueden apoyar o no la existencia transitoria de un DNA-Z con giro a la izquierda.

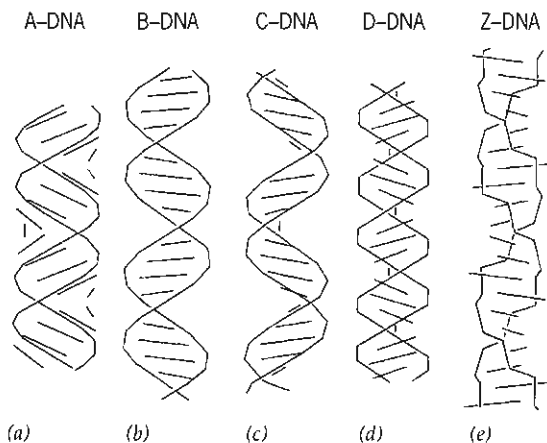


FIGURA 10-11. Conformaciones alternas de DNA. Se muestran segmentos que contienen 20 pares de bases en modelos con giro a la derecha de DNA-A, -B, -C o -D y para DNA-Z con giro a la izquierda. Todas las vistas son perpendiculares al eje helicoidal. Las líneas helicoidales continuas se forman por unión de átomos de fósforo a lo largo de cada cadena. Las líneas segmentadas indican la posición de los pares de bases y se forman por unión del átomo 1'C de cada par de bases. Esta manera simplificada de representación acentúa diferencias en los parámetros helicoidales y en la posición de los pares de bases entre estos modelos. (Reproducido, con permiso, de S.B. Zimmerman, Annual Review of Biochemistry, vol. 51, © 1982 por Annual Reviews Inc.)

Superhélice DNA

En 1963, Jerome Vinograd y sus colaboradores, del California Institute of Technology, descubrieron que dos moléculas de DNA en forma de círculo cerrado y con peso molecular idéntico pueden mostrar velocidad de sedimentación muy diferente cuando se centrifugan a través de un gradiente de densidad (sección 17-11). Un análisis más detallado indicó que las moléculas de DNA que sedimentan con mayor rapidez tienen forma más compacta debido a que la molécula se enrolla sobre sí misma (fig. 10-12, *a,b*), muy parecido a una banda de hule cuyos dos extremos se enrollan en direcciones opuestas, o un cable de teléfono enrollado sobre sí mismo luego de usarse. Este estado del DNA se conoce como **superhélice**. En esta forma el DNA es más compacto que su contraparte relajada, ocupa menos volumen y se mueve con mayor rapidez en un campo de fuerza centrífuga o eléctrica (fig. 10-12, *c*).

La superhélice se entiende mejor cuando se dibuja un tramo de la doble hélice de DNA asentada libremente sobre una superficie plana. En estas condiciones, una molécula posee el número estándar de 10 pares de bases por vuelta de hélice y se dice que está *relajada*. Si los extremos de las dos cadenas simplemente se fusionan para formar un círculo, el DNA aun permanece relajado. Sin embargo, consideremos lo que ocurriría si *antes* de unir los extremos retorcermos la molécula. Si torcemos el DNA a lo largo y en direc-

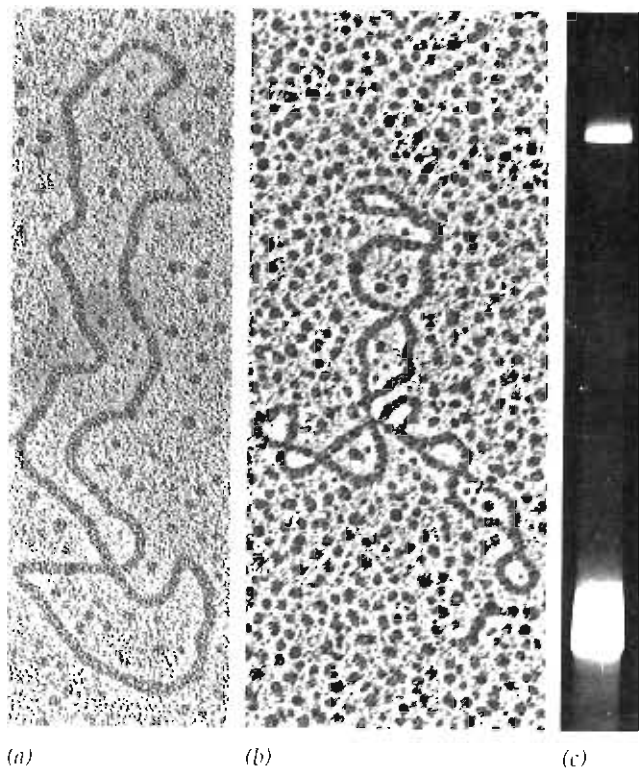


FIGURA 10-12. Superhélice de DNA. *a-b*) Micrografías electrónicas que muestran la diferente conformación de una molécula circular relajada del DNA de un fago (*a*) y el mismo tipo de molécula en una superhélice (*b*). *c*) Cuando se someten a electroforesis en gel una mezcla de moléculas de DNA SV40 relajadas y de superhélices, estas últimas altamente compactas, se desplazan con mucha mayor rapidez en comparación con la forma relajada. Las moléculas de DNA se pueden observar coloreando el gel con bromuro de etidio, una molécula fluorescente que se integra a la doble hélice. (*a* y *b*: Cortesía de James C. Wang; *c*: según Walter Keller, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72.2553, 1975.)

ción opuesta a la cual están enrollados los dobletes, la molécula tiende a desenrollarse. Una molécula de DNA *desenrollada* tiene mayor número de pares de bases por vuelta de hélice (fig. 10-13). La molécula es más estable con 10 residuos por vuelta, por lo que tiende a oponerse al esfuerzo para desenrollarla y vuelve a enrollarse sobre sí misma formando una superhélice (fig. 10-13).

Se dice que la superhélice de DNA es *negativa* cuando se genera por desenrollamiento y *positiva* cuando se forma por retorcimiento excesivo. El DNA circular presente en la naturaleza (p. ej., mitocondrial, viral, bacteriano) invariablemente presenta conformación de superhélice negativa. El enrollamiento excesivo no se restringe al DNA circular pequeño, también ocurre en el DNA lineal eucariota donde tramos de la molécula se enrollan alrededor de núcleos proteínicos, o *nucleosomas* (sección 12-1). El superenrollamiento desempeña un papel clave: permite la compactación del DNA cromosómico para adaptarse a los microscópicos límites del núcleo celular. La superhélice DNA negativa está desenrollada y por lo tanto ejerce presión en el sentido de separar las cadenas, separación requerida durante la duplicación (síntesis de DNA) y en la transcripción (síntesis de RNA).

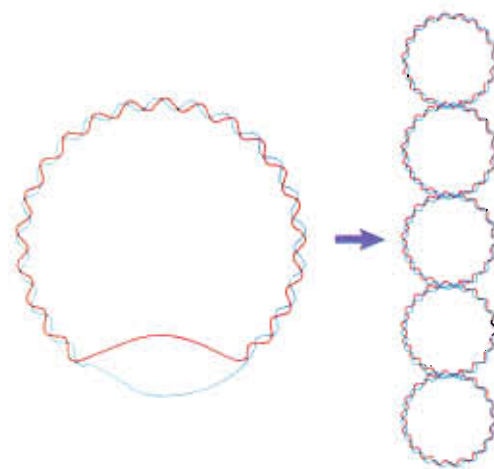


FIGURA 10-13. DNA poco enrollado. La molécula de DNA a la izquierda está subenrollada, o sea, en promedio tiene más de 10 pares de bases por vuelta de una hélice. Una molécula poco enrollada adopta espontáneamente la forma superhelicoidal, como se muestra en el dibujo a la derecha.

Tanto en células procariotas como en eucariotas ciertas enzimas pueden cambiar el estado de superenrollamiento de la doble cadena DNA; estas enzimas se denominan **topoisomerasas**. Las células contienen varias topoisomerasas que pueden dividirse en dos clases, según su mecanismo de acción. La acción de la *topoisomerasa tipo I* consiste en romper transitoriamente una de las cadenas del par y permitir que gire alrededor de la otra cadena (fig. 10-14, *a*) y después volver a unir la porción rota de la cadena; de este modo disminuye la fuerza de torsión de la molécula. La *topoisomerasa tipo II* rompe transitoriamente ambas cadenas del par, a continuación transfiere un segmento de DNA a través de la rotura y vuelve a sellar las cadenas cortadas para “congelar” la molécula en su nuevo estado (fig. 13-13). Además de su capacidad para enrollar y relajar el DNA, las topoisomerasas pueden unir moléculas de DNA y formar o deshacer nudos; también pueden entrelazar (*encadenar*) círculos separados o desunir círculos entrelazados y formar elementos individuales (fig. 10-14, *b,c*).

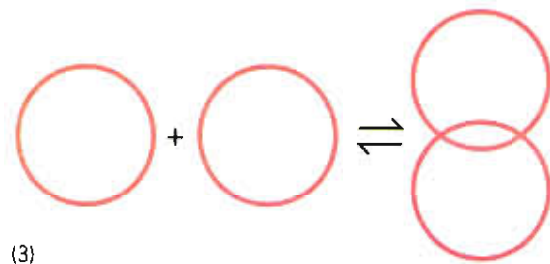
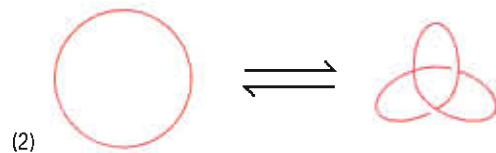
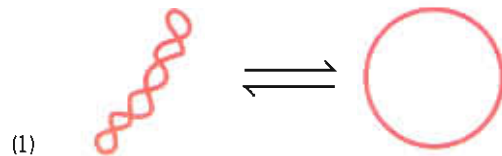
Las topoisomerasas son indispensables en procesos como duplicación y transcripción de DNA, que requieren el desenrollamiento de la doble cadena de DNA. Las topoisomerasas también desempeñan un papel clave durante la mitosis en la separación de pares de cromosomas duplicados. La importancia de estas enzimas se ilustra porque ciertos fármacos, como los antibióticos empleados para destruir células bacterianas o en quimioterapia para detener el rápido crecimiento de células cancerosas, actúan enlazándose a las topoisomerasas e inhibiendo su actividad.

10-3 Estructura del genoma

Por una parte, el DNA es una macromolécula, un ensamble de gran número de átomos enlazados en disposiciones definidas cuya estructura tridimensional se puede conocer



(a)



(b)

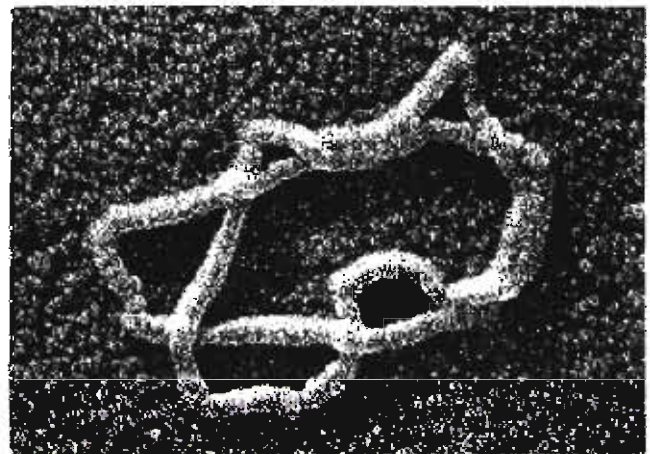
mediante técnicas como cristalografía de rayos X. Por otro lado, el DNA es un depósito de información, una plantilla, una propiedad más difícil de describir en términos moleculares sencillos. Si, como se mencionó antes, un gen corresponde a un segmento particular de DNA, entonces toda la información genética transmitida al descendiente por sus progenitores equivale a la suma de todos los segmentos de DNA presentes en el huevo fertilizado al iniciarse la vida. En toda población, los individuos que constituyen las especies comparten igual conjunto de genes, aunque los diferentes miembros individuales posean invariablemente versiones un tanto diferentes (alelos) de muchos genes. Por lo tanto, cada especie de un organismo posee una dotación única de información genética conocida como su **genoma**. En el ser humano, el genoma prácticamente equivale a toda la información genética contenida en un solo conjunto haploide de 23 cromosomas.

Complejidad del genoma

Para estimar la complejidad del genoma primero es necesario considerar una de la propiedades más importantes de la doble hélice de DNA: su capacidad para separarse en sus dos cadenas componentes, propiedad denominada **desnaturalización**.

Desnaturalización del DNA

Según describieron por primera vez Watson y Crick, las dos cadenas de una molécula de DNA se mantienen juntas por débiles enlaces no covalentes. Una de las propiedades de la doble hélice que se investigó desde un principio fue su desnaturalización mediante calor. Cuando se eleva lentamente



(c)

FIGURA 10-14. Actividades de la topoisomerasa. a) Modelo que muestra la acción de la topoisomerasa I. La enzima tiene seccionada una de las cadenas de DNA, que gira alrededor de la otra cadena. A continuación la cadena cortada se vuelve a unir. b) Tipos de reacciones que pueden catalizar las topoisomerasas. La parte 1 muestra reacciones de superenrollamiento-relajación; la parte 2 presenta reacciones de anudar-desanudar; la parte 3, reacciones de encadenamiento y desencadenamiento. Las líneas más gruesas representan la doble cadena de DNA y las líneas delgadas, cadenas sencillas de DNA. c) Micrografía electrónica de un par de moléculas de DNA circular conectadas (encadenadas). Moléculas de este tipo se acumulan en bacterias que carecen de topoisomerasa específica. (a: Según DNA Topology and its Biologic Effects, N. Cozzarelli y J.C. Wang, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990; c: según Nicolas Cozzarelli, Cell vol. 71, cover # 2, 1992, con permiso de Cell Press.)

la temperatura de una solución de DNA, se alcanza una temperatura específica a la cual se inicia la separación de las cadenas. Luego que la temperatura sube unos pocos grados, el proceso generalmente concluye y la solución contiene moléculas de una sola cadena completamente separadas de sus parejas originales. El avance de la desnaturalización térmica (o *fusión del DNA*) de ordinario se puede observar siguiendo el incremento de absorbancia de las cadenas únicas en comparación con las dobles cadenas de las cuales se originan. Las bases nitrogenadas de una molécula de ácido nucleico absorben radiación ultravioleta con absorbancia máxima cercana a 260 nm (fig. 10-15). Una vez separadas las dos cadenas de DNA, las interacciones hidrofóbicas que resultan del apilamiento de las bases disminuyen mucho, lo que cambia la naturaleza electrónica de las bases e incrementa su absorbancia de radiación ultravioleta. En la figura 10-16 se muestra el aumento de absorbancia que acompaña a la desnaturalización del DNA. La temperatura correspondiente a la mitad del cambio de absorbancia se denomina *temperatura de fusión* (T_f). Cuanto mayor sea el contenido de G-C (%G + %C) del DNA, mayor será la T_f . La mayor estabilidad del DNA cuyo contenido en G-C es más alto refleja la presencia de puentes adicionales de hidrógeno entre las bases en comparación con los pares A-T. La micrografía electrónica de la figura 10-17 muestra que incluso en una sola molécula de DNA los fragmentos ricos en A-T se funden antes que las regiones ricas en G-C.

Renaturalización del DNA

La separación por calor de la doble cadena de DNA no es un dato inesperado, pero parece mucho menos probable que las cadenas sencillas vuelvan a unirse para formar una molécula estable de doble cadena. Sin embargo, en 1960, Julius Marmur y sus colaboradores, de la Universidad Harvard, observaron que enfriando *lentamente* una solución de DNA bacteriano desnaturalizado por calor se restablecen las propiedades de la doble hélice; absorbe menos

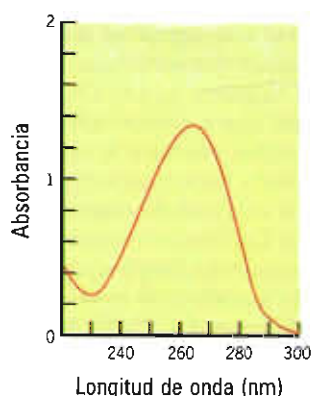


FIGURA 10-15. Espectro de absorción de la timina. Los cuatro nucleótidos del DNA, y por consiguiente el propio DNA, muestran absorbancia máxima cerca de los 260 nm. Esta absorbancia a 260 nm por lo general se emplea para determinar la concentración de ácido nucleico. La tasa de absorbancia a 260/280 nm es una medida de la pureza de la preparación de ácido nucleico, puesto que las proteínas contaminantes casi siempre absorben más fuertemente a 280 nm. La relación 260/280 de DNA purificado es casi de dos.

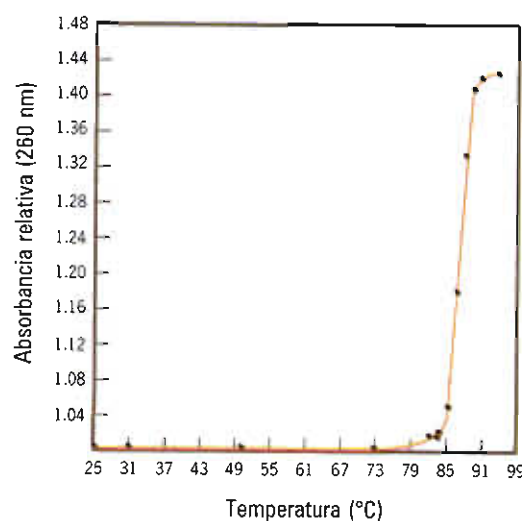


FIGURA 10-16. Desnaturalización térmica del DNA. Curva de desnaturalización térmica para el bacteriófago nativo T6 DNA en citrato de sodio 0.3 M. La "fusión" de DNA (separación de las cadenas) ocurre en un estrecho intervalo de temperatura, particularmente para los DNA más sencillos de virus pequeños. La temperatura correspondiente a la mitad del incremento de absorbancia se denomina T_m . (Según J. Marmur y P. Doty, J. Mol. Biol. 3:593, 1961.)

luz ultravioleta y se comporta otra vez como material genético capaz de transformar las células bacterianas (pág. 427). Se obtienen resultados similares calentando el DNA a 100°C para desnaturalizarlo, disminuyendo rápidamente la temperatura de la solución hasta 25°C, aproximadamente, por abajo de la T_f e incubando el DNA a esta temperatura durante cierto tiempo. Estos estudios demostraron que las moléculas simples de DNA, complementarias en la doble cadena, tenían capacidad para volver a asociarse, suceso denominado **renaturalización**, o **recocimiento**. Esta fue una de las observaciones más valiosas jamás hechas en biología molecular. Por una parte, la renaturalización fue la base de una investigación acerca de la complejidad del genoma, tema analizado en la siguiente sección. Por otra parte, la renaturalización también condujo a desarrollar un método denominado *hibridación del ácido nucleico*, que permite formar moléculas de doble cadena uniendo cadenas complementarias de ácidos nucleicos de origen diferente. La hibridación del ácido nucleico, metodología que aprovecha la extraordinaria especificidad de las cadenas de ácido nucleico para unirse entre sí, se utilizó para responder muchas preguntas básicas de biología molecular. Un ejemplo del tipo de preguntas que pueden responderse mediante hibridación de cadenas simples de ácidos nucleicos se analiza posteriormente en este capítulo (pág. 406) y se ilustra en la figura 10-21.

Complejidad de los genomas viral y bacteriano

Varios factores determinan la tasa de renaturalización de una preparación determinada de DNA. Estos son: 1) fuerza iónica de la solución; 2) temperatura; 3) concentración de DNA; 4) período de incubación y 5) tamaño de las moléculas que interactúan. Con esto en mente, consideremos lo

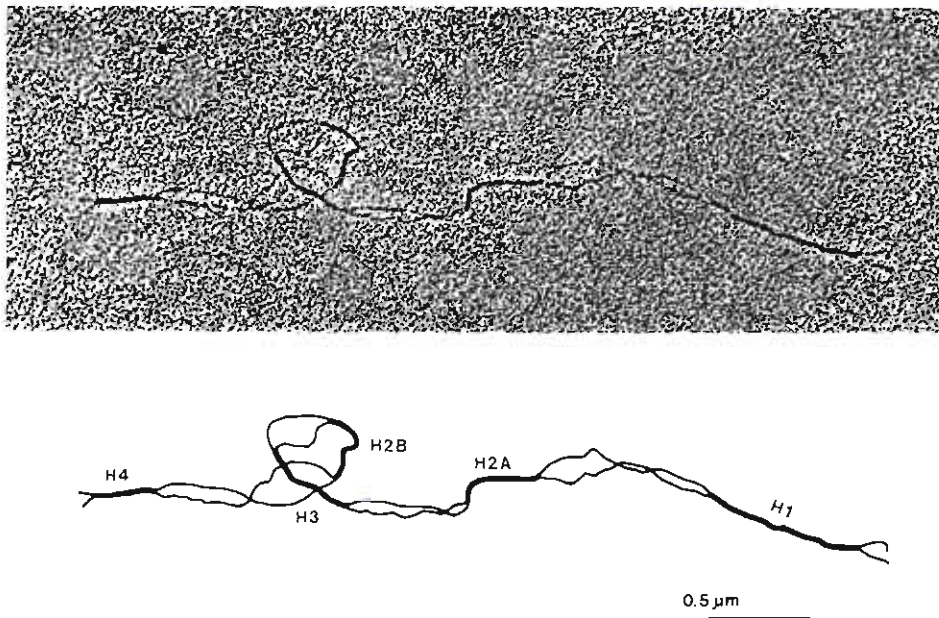


FIGURA 10-17. Relación entre temperatura de fusión y contenido de GC. Micrografía electrónica que muestra un segmento de DNA del huevo de un erizo de mar que contiene genes para los cinco tipos de moléculas de histona (estudiados en la sección 12-1 e indicados en el mapa acompañante). Las regiones de DNA que sufren la separación de cadenas en las condiciones empleadas se observan como segmentos delgados de una sola cadena. Estas regiones corresponden a segmentos ricos en pares de bases A-T situados entre las porciones de DNA que realmente codifican las proteínas de histona. (b: Cortesía de R. Portmann y M.L. Birnstiel, derechos reservados.)

que pudiera ocurrir si se compara la tasa de renaturalización de tres DNA diferentes, cada uno constituyendo el genoma entero de: 1) un virus pequeño como el SV40 (5.4×10^3 pares de nucleótidos); 2) un virus de mayor tamaño, como T4 (1.8×10^5 pares de nucleótidos), y 3) una célula bacteriana como *E. coli* (4.5×10^6 pares de nucleótidos). La principal diferencia entre estos DNA es su longitud. Para comparar su renaturalización es importante que las moléculas reaccionantes sean de longitud equivalente, típicamente casi 1 000 pares de bases. Se pueden fragmentar las moléculas de DNA en pedazos de esta longitud de varias maneras: una es ejerciendo fuerza mediante alta presión a través de un pequeño orificio.

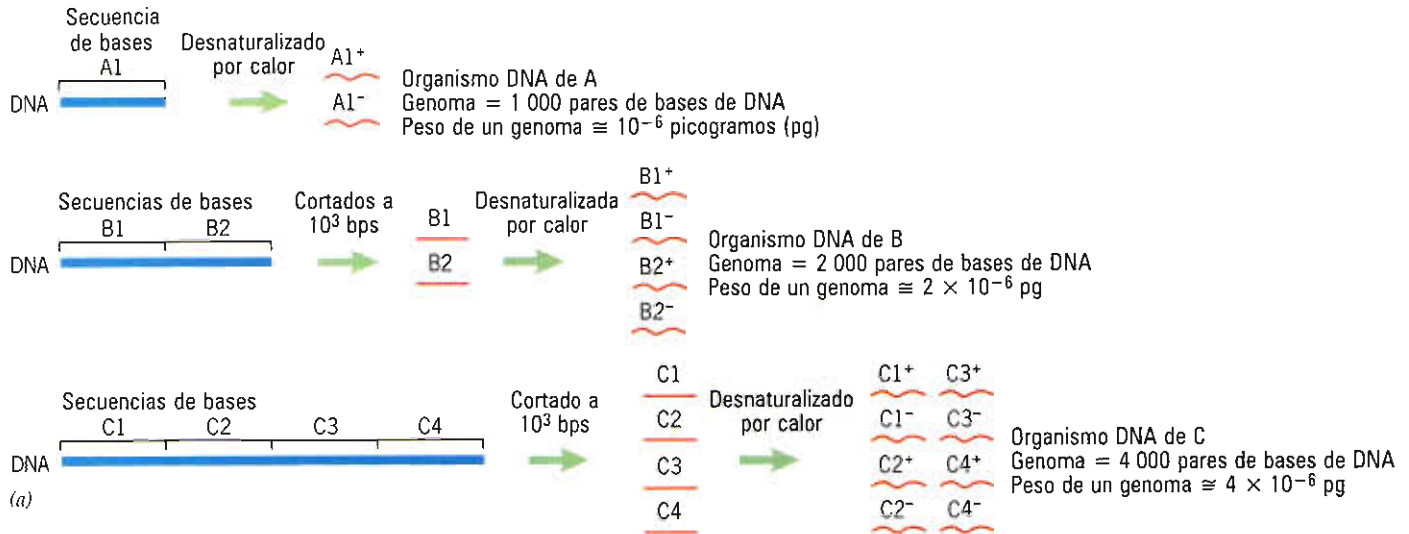
Cuando se permitió renaturalizar estos tres tipos de DNA, todos presentes a la misma longitud e igual concentración (mg/ml), lo hicieron a tasas notablemente diferentes (fig. 10-19). Cuanto más pequeño el genoma, más rápida la renaturalización. La razón fue evidente al considerar la concentración de las secuencias complementarias en las tres preparaciones. Puesto que las tres preparaciones tienen la misma cantidad de DNA en un volumen determinado de solución, se deduce que cuanto más pequeño el genoma, mayor será el número de genomas presentes con determinado peso de DNA y mayor la probabilidad de colisión entre fragmentos complementarios. Esto se ilustra por el caso hipotético mostrado en la figura 10-18. Se observa el mismo perfil de renaturalización sin importar si los tres DNA se renaturalizan en tubos separados o juntos en la misma solución (fig. 10-18, b,c). Esto ilustra un principio importante de las reacciones de hibridación: la velocidad de reacción entre moléculas de secuencias complementarias

no es afectada por la presencia de moléculas con secuencias no relacionadas.

Complejidad de los genomas eucariotas

La renaturalización de los DNA viral y bacteriano ocurre siguiendo una curva simétrica sencilla (fig. 10-19). La curva de renaturalización tiene esta forma porque todas las secuencias están presentes en igual concentración (salvo unas pocas secuencias del DNA bacteriano). Por consiguiente, en esa población cada secuencia de nucleótidos tiene probabilidad de encontrar una pareja en un tiempo determinado respecto de cualquier otra secuencia. Diferentes estudios de mapeo genético sugieren que el DNA de un cromosoma contiene los genes uno a continuación del otro en disposición lineal, y permiten pronosticar este resultado. Los datos de genomas virales y bacterianos contrastan notablemente con los obtenidos en DNA de mamífero por Roy Britten y David Kohne, del California Institute of Technology. A diferencia de genomas más simples, los fragmentos del DNA de un genoma de mamífero se renaturalizan a velocidades notablemente diferentes (fig. 10-20). Esas diferencias reflejan el hecho de que en una preparación de fragmentos de DNA eucariota, las distintas secuencias de nucleótidos se encuentran presentes a concentraciones muy variadas. Este fue el primer indicio de que el DNA eucariota no es una simple progresión de genes uno después de otro, como en bacterias y virus, sino una organización mucho más compleja.

Cuando se renaturalizan fragmentos de DNA procedentes de plantas y animales, la curva de ordinario muestra tres pasos distintivos (fig. 10-20), que corresponden a la renaturalización de tres clases muy abundantes de secuen-



Experimento de renaturalización

- 1) Extracto de DNA de cada uno de los tres organismos hipotéticos mostrados antes
- 2) Disolver cada DNA en un volumen de amortiguador (p. ej., 0.12 M de fosfato de sodio) de modo que la concentración final sea de 5 mg/ml
- 3) Cortar el DNA de B y de C a 10^3 bps (A, B y C a igual longitud)
- 4) Desnaturalizar como se muestra antes
- 5) Incubar cada solución a 60°C y seguir el avance de la renaturalización como se muestra en las curvas de abajo

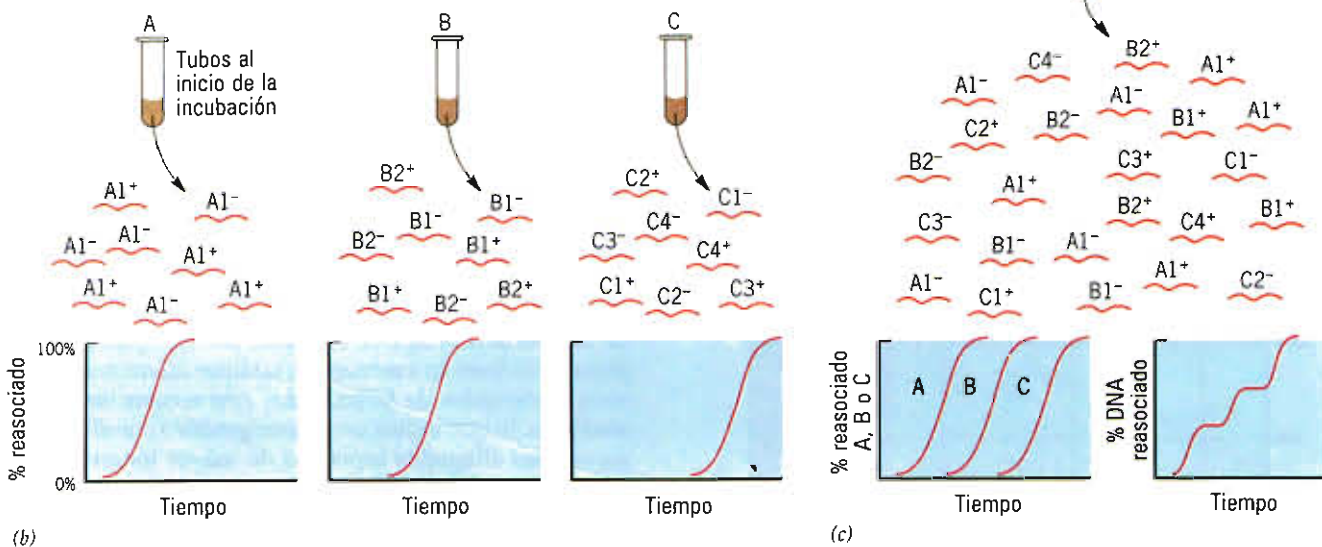


FIGURA 10-18. Experimento hipotético acerca de la renaturalización del DNA de tres organismos diferentes. a) Genoma de cada uno de los organismos. En cada preparación, el DNA está cortado en fragmentos de 1 000 pares de bases de longitud y desnaturalizado en cadenas únicas mediante calor. Cada copia de un genoma de A produce un par de fragmentos complementarios; cada una de B da lugar a dos pares de fragmentos complementarios, y cada una de C da cuatro pares de fragmentos complementarios. b) Comparación de las tasas de renaturalización de los tres diferentes DNA cuando todos están presentes a la misma concentración. c) Renaturalización del DNA cuando existen las tres preparaciones en la misma mezcla. La gráfica de la izquierda indica la curva de renaturalización del DNA de cada uno de los tres organismos. La gráfica de la derecha sigue la renaturalización del DNA total. (En verdaderos experimentos de este tipo, como el que se muestra en la siguiente figura, se grafica la formación de dobles cadenas de DNA contra C_0t , término que combina dos variables; concentración de DNA y tiempo de incubación. Una solución con una concentración elevada de DNA incubada durante breve tiempo tendrá el mismo C_0t que una de baja concentración incubada durante un tiempo correspondientemente mayor; ambas tendrán el mismo porcentaje de DNA renaturalizado. Si todas las otras variables se mantienen constantes, la C_0t a la cual la mitad del DNA se ha renaturalizado es una medida sensible del peso molecular de estos tipos simples de genomas.)

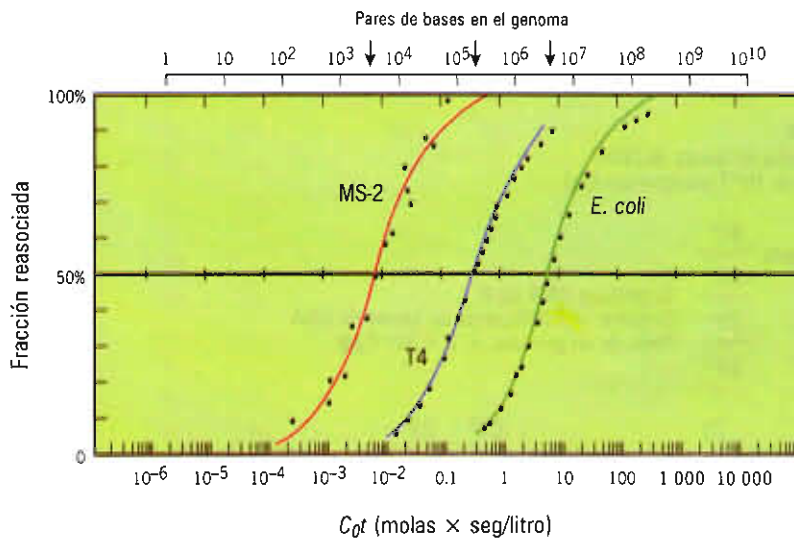


FIGURA 10-19. Cinética de la renaturalización del DNA más simple (DNA sintético, viral y bacteriano). Las curvas muestran la renaturalización de cadenas seccionadas de DNA a partir de la fuente indicada. El tamaño del genoma, o sea, el número de pares de bases de nucleótidos presentes en una copia de toda la información genética del organismo, está indicada por las flechas cerca de la escala numérica de arriba. La forma de cada curva de renaturalización es muy simple y muestra una sola pendiente. Sin embargo, el tiempo de renaturalización es muy diferente y depende de la concentración de fragmentos complementarios, que a su vez depende del tamaño del genoma. Cuanto más grande sea el genoma, menor será la concentración de fragmentos complementarios en la solución y mayor el tiempo necesario para concluir la renaturalización.

cias de DNA. Las tres se renaturalizan a diferente velocidad porque difieren en cuanto al número de veces que su secuencia de nucleótidos se repite dentro de la población de fragmentos. Cuanto más grande sea el número de copias de una secuencia particular en el genoma, mayor será su concentración y más rápida su renaturalización. Los tres tipos se denominan **fracción altamente repetida**, **fracción moderadamente repetida** y **fracción no repetida**.

Secuencias de DNA altamente repetidas. La fracción altamente repetida consta de secuencias presentes en cuando menos 10^5 copias por genoma y típicamente constituye casi 10% del DNA total de los vertebrados. Esta fracción del genoma se renaturaliza con tal rapidez que su progresión sólo puede seguirse en soluciones diluidas donde la concentración de reactantes sea muy baja. Las secuencias altamente repetidas por lo general son cortas (unos pocos cien-

tos de nucleótidos en su mayor longitud) y se presentan en grupos donde la secuencia dada se repite una y otra vez sin interrupción. Una secuencia dispuesta de este modo de un extremo a otro se dice que está presente *en secuencia*. Las secuencias altamente repetidas pertenecen a varias categorías superpuestas, incluyendo DNA satélite, DNA minisatélite y DNA microsatélite.

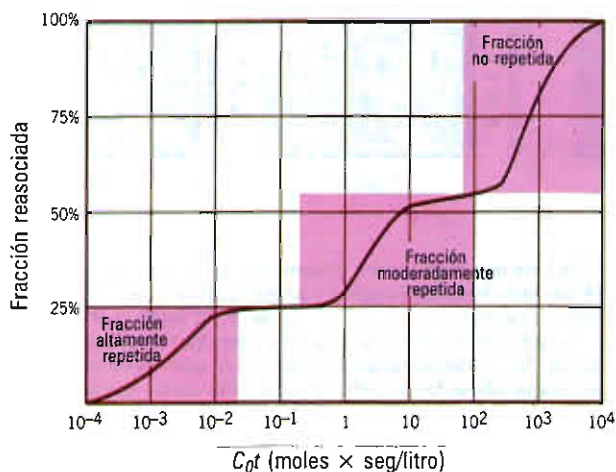


FIGURA 10-20. Cinética de la renaturalización del DNA eucariota. Los datos indican la presencia de tres clases distintas de fragmentos diferenciables por la repetición de sus secuencias dentro del genoma: DNA altamente repetido, DNA moderadamente repetido y DNA no repetido (copias únicas).

- **DNA satélite.** El DNA satélite consta de secuencias cortas (de 5 a 100 pares de bases de longitud) repetidas gran número de veces para formar grupos muy amplios que contienen hasta 100 millones de pares de bases de DNA. En muchas especies, la composición de bases de estos segmentos DNA es muy diferente de la masa de DNA, y durante centrifugación en gradiente de densidad se pueden separar fragmentos con la secuencia en bandas "satélite" distintas (de ahí su nombre DNA *satélite*). Algunas especies pueden tener más de una secuencia de DNA satélite; por ejemplo, *Drosophyla virilis* tiene tres secuencias satélites diferentes cada siete nucleótidos de largo, todas con secuencias muy similares, lo que indica un origen genético común. Las secuencias altamente repetidas de mayor longitud no aparecen como bandas separadas en gradientes de densidad, puesto que su composición total de bases de ordinario no es muy diferente a la del DNA restante.
- **DNA minisatélite.** Las secuencias minisatélite tienen en promedio alrededor de 15 pares de bases de longitud y se encuentran en grupos que contienen hasta 1 000 o 3 000 repeticiones. Por lo tanto, las secuencias minisatélite ocupan tramos mucho más cortos del genoma en comparación con las secuencias satélite.
- **DNA microsatélite.** Las secuencias microsatélite son las más cortas (2 a 5 pares de bases de longitud) y se presentan en grupos de 100 o menos copias repetidas en promedio. Las secuencias microsatélites se dispersan a través del DNA, y en el genoma humano se encuentran cuando menos 30 000 locus microsatélite diferentes.

Sabiendo que el genoma contiene gran número de copias de secuencias cortas de DNA, una de las primeras preguntas que surgen es: ¿en qué sitio del cromosoma se localizan las secuencias de DNA? Anteriormente mencionamos que las observaciones iniciales de renaturalización de DNA condujeron a desarrollar una vasta metodología de hibridación de ácidos nucleicos (revisada con detalle en el capítulo 17). Podemos hacer ahora la misma pregunta respecto de la localización de la secuencia de DNA satélite para ilustrar la potencia analítica de la hibridación de ácidos nucleicos.

En los experimentos de renaturalización descritos anteriormente se permitió que las cadenas complementarias de DNA se enlazaran entre sí mientras chocaban al azar dentro de la solución. Mary Lou Pardue y Joseph Gall, de la Universidad de Yale, desarrollaron un protocolo experimental alterno denominado **hibridación *in situ***, inicialmente utilizado para responder la pregunta planteada antes acerca de localización del DNA satélite. El término *in situ* ("en su sitio") quiere decir que el DNA de los cromosomas se

mantiene en su sitio mientras reacciona con una preparación particular de DNA marcado. Para efectuar la hibridación de ácidos nucleicos, ambos interactuantes deben ser cadenas sencillas. En el experimento mostrado en la figura 10-21, *a*, se preparó una muestra de cromosomas mitóticos sobre una laminilla o cubreobjetos. A continuación, el DNA de los cromosomas se convierte en cadenas únicas al tratar a los cromosomas con solución alcalina que separa las cadenas de DNA y las mantiene desunidas. Durante la subsecuente etapa de hibridación, los cromosomas desnaturalizados se incuban en solución que contiene DNA satélite marcado de una sola cadena que puede unirse selectivamente a cadenas complementarias del DNA satélite inmovilizado en los cromosomas. Luego del periodo de incubación, se lava el DNA satélite soluble no hibridado o se digiere y se prepara un frotis para revelar los sitios donde se encuentran unidos los fragmentos de DNA marcados. En los primeros estudios de hibridación, las cadenas de DNA soluble se marcaron con isótopos radiactivos y la localiza-

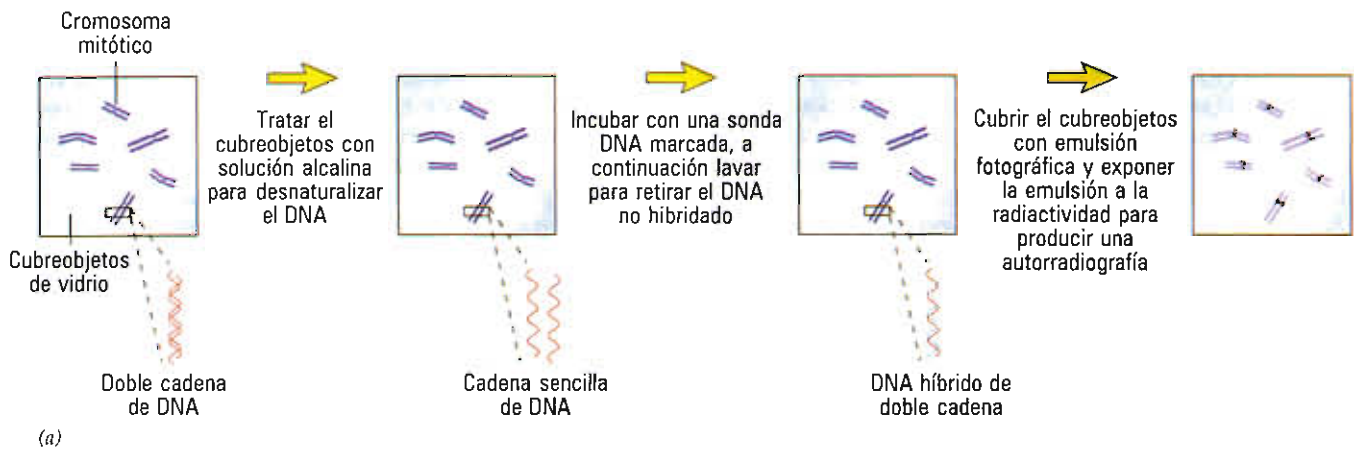


FIGURA 10-21. Hibridación *in situ* y localización del DNA satélite. *a)* Etapas en el procedimiento de hibridación *in situ*, según se describe en el texto. En este ejemplo, las secuencias de DNA satélite se localizaron por medio de autorradiografía. *b)* Localización de DNA satélite en el centrómero de los cromosomas humanos mediante fluorescencia de hibridación *in situ* (FHIS). Para efectuar este experimento se unió DNA α -satélite purificado a biotina y se incubó con los cromosomas cuyo DNA se había desnaturalizado. La localización del DNA biotinilado enlazado se descubre con una sonda fluorescente que se enlaza específicamente a biotina. La fluorescencia amarilla denota la presencia de DNA satélite hibridado contra un fondo de cromosomas contrateñidos de rojo. La localización de la marca en el centrómero se comprueba por la constricción del cromosoma, que es evidente en dicho sitio. (*b*: Según Huntington F. Willard, Trends Genetics 6:414, 1990.)



(b)

ción de los fragmentos de DNA enlazados se determinó por medio de autorradiografía (como en la figura 10-32). Recientemente se observó que se puede obtener mayor resolución mediante localización de fluorescencia. Con esta técnica, denominada *fluorescencia de hibridación in situ* (FISH), los fragmentos de DNA soluble se conjugan con biotina y se localizan fragmentos enlazados a cromosomas por interacción con una proteína fluorescente (llamada avidina) que se enlaza específicamente a la biotina con afinidad muy elevada. Mediante hibridación *in situ* se ha demostrado repetidamente que el DNA satélite se localiza en los centrómeros de los cromosomas. Sin embargo, a pesar de más de veinte años de investigación todavía no está claro el papel del DNA satélite. Otros ejemplos de hibridación *in situ* se muestran en las figuras 10-24, 10-26, 10-28 y 10-32.

La posición y el número de copias de la secuencia microsatélite varía mucho de una persona a otra, incluso entre miembros de la misma familia. Un ejemplo de esta variabilidad se observa en el gen denominado FMR1, cuya función no está definida con precisión. De cualquier manera, un alelo normal de este gen contiene entre 5 y 60 copias de un tripleto específico (CCG) que se repite en una parte del gen que no codifica incorporación de aminoácidos. Una persona puede ser portadora de casi 200 copias de este tripleto sin mostrar efectos adversos. Sin embargo, cuando el número de copias se eleva a poco más de 60, el locus se convierte en un sitio muy inestable y el número de copias tiende a incrementar con rapidez. Por lo tanto, personas con 60 a 200 copias del tripleto, aunque normales en sí, son portadoras de un cromosoma muy inestable que transmiten a su descendencia. Si el número de repeticiones en la descendencia es mayor de 200, el individuo casi siempre presenta retraso mental. Esta enfermedad, conocida como *síndrome X frágil* porque de ordinario se acompaña de un sitio frágil sobre el cromosoma X, es causa común de retraso mental hereditario. En la figura 10-22 se muestra la relación entre número de copias del tripleto y fenotipo. En la enfermedad de Huntington, se demostró otro trastorno hereditario devastador como causa de un incremento similar del número de copias de la secuencia de un tripleto. En otras

enfermedades (cuadro 10-2) y en ciertos tipos de cáncer también se implican modificaciones en las secuencias minisatélite y microsatélite.

En el genoma hay miles de sitios que muestran un número variable de microsatélites repetidos (*polimórficos*). Todavía no está claro si estas simples secuencias repetidas desempeñan o no un papel en la estructura del DNA o en su función, pero su presencia se aprovecha para elaborar mapas genéticos, aislar genes causantes de enfermedades humanas y desarrollar la técnica de dactiloscopia de DNA (fig. 10-23). El mecanismo que modifica el número de copias de estas cortas secuencias repetidas aún es motivo de especulación.

Secuencias de DNA moderadamente repetidas. La fracción moderadamente repetida del DNA puede variar desde casi 20 hasta cerca de 80% del DNA total, según el organismo. Esta fracción incluye secuencias repetidas en cualquier parte del genoma, desde unas pocas veces hasta varios cientos de miles. Las secuencias moderadamente repetidas pertenecen a distintas familias, cuyos miembros pueden ser: 1) idénticos entre sí, o 2) no idénticos pero relacionados. Entre las secuencias de DNA moderadamente repetidas se incluyen las que codifican productos conocidos del gen, sea RNA o proteínas, y las que carecen de función codificadora.

1. Secuencias de DNA repetidas con función codificadora. Esta fracción incluye genes que codifican RNA de transferencia y RNA ribosómico, y también los que codifican un importante grupo de proteínas cromosómicas, las histonas. Las secuencias repetidas que codifican cada uno de estos productos de ordinario son idénticas entre sí y se colocan en serie. Es indispensable la presencia de múltiples genes codificadores de los RNA ribosómicos y de transferencia, puesto que se requieren grandes cantidades de estos RNA y su síntesis no se beneficia de un paso extra de amplificación, como ocurre para genes que codifican proteínas, en los cuales el RNAm puede actuar como plantilla para la síntesis de muchos polipéptidos. Aunque la producción de histonas implica un RNA mensajero intermedio, durante el inicio del desarrollo de muchos animales los requerimientos de proteína de este tipo son muy grandes en un periodo sumamente breve y se necesitan varios cientos de plantillas de DNA para la tarea.

2. DNA repetido que carece de función codificadora. La gran cantidad de secuencias de DNA moderadamente repetidas no codifican producto alguno. En vez de ocurrir como grupos o secuencias en fila, los miembros de estas familias se dispersan a través del genoma como elementos individuales. La mayor parte de estas secuencias repetidas se pueden agrupar en dos clases, conocidas como ECIN (elementos cortos interpuestos) o ELIN (elementos largos interpuestos). Los ECIN típicamente presentan longitud menor de 500 pares de bases, en tanto que los ELIN tienen más de 1 000 pares de bases de largo. Las secuencias de nucleótidos de estos elementos varían mucho de una especie a otra; en el ser humano se encuentran dos familias de secuencias repetidas (*Alu*, que es un ECIN, y *L1*, que es un ELIN) que se estudian en la página 414. Todavía se espera una respuesta satisfactoria a si estas secuencias repetidas tienen alguna función en la expresión del gen o simplemente

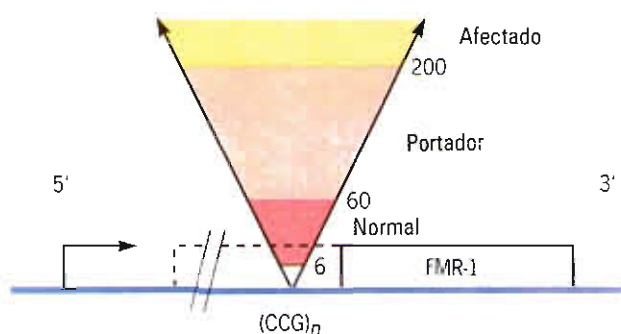


FIGURA 10-22. Relación entre trinucleótidos repetidos y desarrollo del síndrome de X frágil. La flecha señala el sitio de inicio de la transcripción. El recuadro indica el segmento codificante del gen FMR-1. (Según R.I. Richards y G.R. Sutherland, Cell 70:710, 1992, con permiso de Cell Press.)

CUADRO 10-2. Enfermedades genéticas por reiteración del trinucleótido

Enfermedad	Trinucleótido reiterado	Intervalo normal de reiteración	Intervalo de reiteración en la enfermedad	Reiteraciones en la región codificante
Atrofia muscular bulboaraquídea	CAG	11-33	40-62	Sí
Enfermedad de Huntington	CAG	11-34	42-100	Sí
Ataxia espinocerebelosa tipo 1	CAG	<29-36	43->60	Tal vez
X frágil	CCG	6-54	250-4 000	No
Distrofia miotónica	CTG	5-30	>50	No

FUENTE: H. Green, *Cell* 74:956, 1993, con permiso de Cell Press.

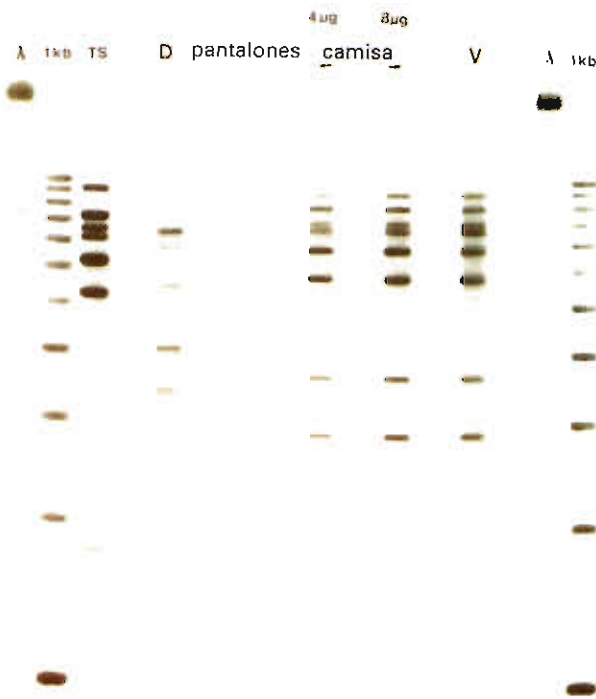


FIGURA 10-23. Dactiloscopia de DNA. En esta técnica, ampliamente utilizada para determinar la identidad de un individuo a partir de una muestra de DNA, el DNA se digiere mediante tratamiento con nucleasas de restricción específicas (como en la figura 10-36), y los fragmentos de DNA se sujetan a electroforesis en gel. La localización de fragmentos de DNA que contengan secuencias específicas en gel se determina utilizando sondas con marcas radiactivas y secuencias complementarias a las observadas. Los fragmentos de DNA que se unen a estas sondas varían de longitud de una persona a otra debido a la presencia de un número variable de secuencias cortas repetidas en el genoma. La autorradiografía mostrada en esta figura se utilizó en el caso de un criminal; el presunto culpable enfrentó la acusación de apuñalar y dar muerte a una joven mujer. Las manchas de sangre sobre los pantalones y la camisa del acusado se compararon contra muestras estándar conocidas de sangre de la víctima y del acusado. El DNA de las manchas de sangre de las ropas del acusado no coincidió con sus propias muestras de sangre pero sí con las de la víctima. Las filas contienen DNA de las siguientes fuentes: 1, 2, 3, 9 y 10 son muestras testigo de DNA que sirven como control de calidad; 4, sangre del acusado; 5, manchas de sangre de los pantalones del acusado; 6 y 7, manchas de sangre de la camisa del acusado, y 8, sangre de la víctima. (Cortesía de Cellmark Diagnostics.)

te son "basura" que tiende a acumularse en los genomas como resultado de los diferentes procesos analizados más adelante.

Secuencias de DNA no repetidas. Como lo pronosticó Mendel desde el principio, los estudios clásicos acerca de patrones hereditarios de rasgos visibles condujeron a los genetistas a la conclusión de que sólo hay una copia de cada gen en cada conjunto de cromosomas haploides. Cuando se permite la renaturalización de DNA eucariota, una fracción significativa de los fragmentos (70% de los fragmentos de DNA humano en una longitud de 1 000 pares de bases) resulta muy lenta para encontrar pareja, tan lenta que en realidad se asume que hay una sola copia por genoma. Esta fracción representa secuencias de DNA *no repetidas* (*copias únicas*), entre las cuales se incluyen los genes que muestran patrones de herencia mendeliana. Debido a la existencia de una sola copia en el genoma, los genes no repetidos siempre se localizan sobre un sitio específico de cromosoma particular (fig. 10-24).

Considerando la gran variedad de secuencias presentes, la fracción no repetida contiene, con mucho, la mayor cantidad de información genética. La fracción no repetida incluye secuencias de DNA que codifican casi a todas las proteínas diferentes de histonas. Aunque estas secuencias no presentan múltiples copias, cada vez hay más pruebas de que los genes codificadores de polipéptidos casi siempre son miembros de una familia o superfamilia de genes relacionados. Esto es verdad para globinas, actinas, miosinas, colágena, tubulinas, integrinas y tal vez la mayor parte de las proteínas de una célula eucariota. Cada miembro de una familia de multigenes es codificado por una secuencia no repetida diferente pero relacionada.

10-4 Estabilidad del genoma

Debido a que el DNA es el material genético, solemos imaginarlo como una molécula estable cuyo contenido de información sólo varía lentamente durante largos periodos de la evolución. Sin embargo, las pruebas indican que la organización de las secuencias del genoma puede cambiar con rapidez, no sólo en el orden evolutivo, sino en cuanto al periodo de vida de determinado individuo.



FIGURA 10-21 Localización cromosómica de una secuencia de DNA no repetida. Esta preparación de cromosomas mitóticos se elaboró a partir de una célula de ratón en etapa de división y se incubó con una preparación purificada de DNA que codifica una de las proteínas laminares nucleares (lámina B₂) codificada por un gen no repetido. Antes de incubar la lámina B₂ de DNA con los cromosomas se unió a biotina mediante enlaces covalentes. Luego de la incubación se lavó la preparación para eliminar el DNA no enlazado específicamente a los cromosomas, y los sitios sobre los cromosomas que contenían DNA biotinilado se revelaron incubando la preparación con una sonda fluorescente que se une a la biotina con gran afinidad. Los sitios donde se une la sonda, que indican la localización del gen laminar dentro de los cromosomas, aparecen como puntos brillantes. El gen laminar aparece sobre el cromosoma 10. Cada cromosoma contiene dos copias del gen debido a que el DNA se duplicó antes que las células iniciaran la mitosis. (Según Monika Zewe y cols., cortesía de Werner Franke, Eur. J. Cell Biol. 56:349, 1991.)

Duplicación y modificación de las secuencias del DNA

Podemos iniciar el examen de estabilidad del genoma con el dato bien establecido de que los organismos eucariotas contienen familias de multigenes que codifican polipéptidos con secuencias relacionadas de aminoácidos. Se cree que todos los miembros de una familia de multigenes se originan de una sola copia ancestral repetida en el curso de la evolución. El primer paso en este tipo de amplificación consiste en duplicar alguna región del cromosoma, hecho que puede ocurrir conforme se sintetiza DNA, pero que con mayor probabilidad se produce mediante un proceso de *entrecruzamiento desigual*, como se muestra en la figura 10-25. Hay entrecruzamiento desigual cuando un par de cromoso-

mas homólogos se juntan durante la meiosis sin estar perfectamente alineados. Como resultado de esta mala alineación, el intercambio genético entre homólogos genera un cromosoma con un segmento extra de DNA (**duplicación**) y otro cromosoma con un segmento menos de DNA (**supresión**). Si la duplicación de una secuencia particular continúa en generaciones subsecuentes, se genera un grupo de segmentos repetidos en fila en un sitio localizado dentro de dicho cromosoma (fig. 10-26).

Una vez producidas múltiples copias de una secuencia mediante el proceso de duplicación, sería de esperar que la sustitución de nucleótidos modifique de diferente manera a varios miembros, generando una familia de multigenes cuyos miembros individuales presenten variaciones en las secuencias de aminoácidos. Esto se ilustra por la evolución de los genes de globina.

Evolución de los genes de globina

Como se muestra en la figura 2-40, *b*, la hemoglobina es un tetrámero compuesto por cuatro polipéptidos de globina. El examen de los genes de globina, de mamífero o de peces, revela una organización muy característica. Cada uno de estos genes está formado por tres exones y dos intrones. Según se analizará con detalle en el siguiente capítulo, los exones son parte de genes que codifican aminoácidos en el polipéptido codificado, en tanto que los intrones no lo son: éstos son más bien secuencias interpuestas no codificantes. Por ahora, consideraremos estas partes de gen como indicadores de evolución. El examen de ciertos polipéptidos semejantes a globina, como la proteína vegetal denominada leghemoglobina y la proteína muscular mioglobina, revela la presencia de cuatro exones y tres intrones. Se cree que el polipéptido de globina actual se originó de una forma ancestral como resultado de la fusión de dos exones (paso 1, figura 10-27), hace unos 800 millones de años. Se sabe que algunos peces primitivos sólo tienen un gen de globina (paso 2), lo que sugiere que dichos peces se separaron de otras estirpes de vertebrados antes de la duplicación del gen (paso 3). Luego de su duplicación, hace unos 500 millones de años, el gen se apartó por mutación (paso 4) para formar dos tipos distintos de globina, uno α y otro β . Se cree que en pasos subsecuentes, las formas α y β se separaron mediante un proceso de transposición o translocación convirtiéndose en cromosomas separados (paso 5). A continuación, cada gen sufrió duplicaciones y divergencias subsecuentes (paso 6), generando la organización actual observada en seres humanos (paso 7). Los genes α -globina del genoma humano se ubican sobre el cromosoma 16, en tanto que los genes β -globina se encuentran en el cromosoma 11.

Según se analizó en el capítulo 2, la molécula de hemoglobina consta de dos pares de polipéptidos (subunidades): un par que siempre es miembro de la subfamilia α -globina y el otro par que siempre pertenece a la subfamilia β -globina. Las combinaciones específicas de globinas α y β se ensamblan durante la construcción de moléculas de hemoglobina en diferentes etapas del desarrollo. En la figura 10-27 se muestran las cadenas de globina α y β requeridas para la síntesis de hemoglobinas embrionaria, fetal y del adulto.

Otra característica de la evolución del gen, revelada por el análisis de los grupos de globina, fue la presencia de

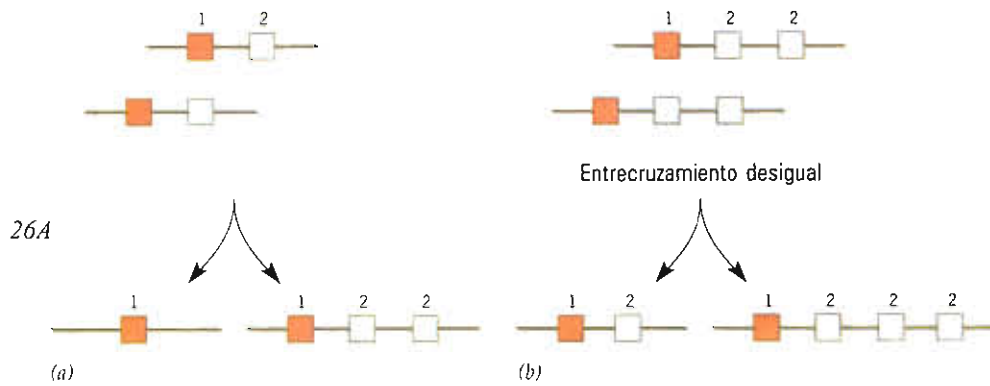


FIGURA 10-25. El entrecruzamiento desigual entre genes duplicados suministra un mecanismo para generar cambios en el número de genes. *a)* La etapa inicial mostrada tiene dos genes relacionados (1 y 2). En un individuo diploide, el gen 1 sobre un homólogo se puede alinear con el gen 2 del otro homólogo durante la meiosis. Si durante esta alineación equivocada ocurre entrecruzamiento, los dos gametos perderán un gen 2 y ambos tendrán un gen 2 extra. *b)* Conforme el entrecruzamiento desigual continúa durante las divisiones meióticas en generaciones subsiguientes, gradualmente evolucionará una secuencia de arreglos de DNA repetidos en serie.

“genes” con secuencias claramente homólogas de genes funcionales de globina, pero con mutaciones graves acumuladas que funcionalmente los excluyen por completo. Los genes de este tipo en realidad son reliquias evolutivas que se conocen como *seudogenes*, y su presencia en los genomas

está muy difundida. En ambos grupos de genes de globina α y β de la figura 10-27 se observan ejemplos de *seudogenes*. Otro punto importante del examen de los dos grupos de globina de los cromosomas humanos es la cantidad de DNA que consta de secuencias no codificantes, sea como intrones dentro de los genes o como espaciadores entre los mismos. En realidad, menos de 15% del DNA localizado en estas regiones codifica la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de globina; el resto consta de regiones no codificantes, que en su mayor parte carecen de función conocida. Estudios de secuencias de DNA de diferentes especies indican que las distintas partes de la región evolucionan a velocidad muy variable. El DNA de las regiones codificantes es muy constante, en tanto las regiones no codificantes son mucho más variables. Más aún, los cambios descubiertos en regiones codificantes casi siempre son simples sustituciones de bases, en tanto que los cambios de porciones no codificantes con frecuencia incluyen adiciones y supresiones de segmentos de DNA.

En algunos casos, los polipéptidos codificados por determinada familia de secuencias evolucionaron con funciones divergentes, aunque la secuencia de aminoácidos todavía muestra su relación ancestral. Por ejemplo, la hormona del crecimiento y la prolactina son dos hormonas hipofisarias con una secuencia de aminoácidos claramente relacionada que evoca respuestas totalmente diferentes en sus células efectoras. Incluso si el cambio en la secuencia de aminoácidos de una proteína particular es muy pequeño durante largos periodos de la evolución, como en el caso de las actinas (pág. 355), siempre hay diferencias sustanciales de la secuencia de nucleótidos entre genes correspondientes a organismos evolutivamente distantes pero relacionados. Las sustituciones toleradas de nucleótidos son aquellas que no alteran las secuencias de aminoácidos en las cadenas de polipéptidos.²

² Según se analiza en el capítulo 11, un mismo aminoácido puede ser codificado por varios tripletos de nucleótidos diferentes (codones). Por consiguiente, la secuencia de nucleótidos puede cambiar sin que varíe la secuencia de aminoácidos codificada.



FIGURA 10-26. Localización de una región en cromosomas humanos que contiene un gen recientemente duplicado. La micrografía muestra los cromosomas mitóticos de un varón incubados con DNA de un gen que participa en la enfermedad del riñón poliquístico. Igual que en los ejemplos previos de hibridación *in situ*, se desecha el DNA no enlazado, y el sitio donde el DNA se enlaza con su DNA complementario en el cromosoma se identifica mediante una sonda fluorescente enlazada. La flecha indica una región del cromosoma 16 que contiene varias copias de la sonda enlazada. Un análisis posterior indicó la presencia de tres genes (*HG-A*, *HG-B* y *HG-C*) cuya secuencia de nucleótidos es lo bastante parecida para enlazarse a la misma sonda de DNA. El hecho de que las secuencias no difieran significativamente indica que su duplicación ocurrió en ancestros recientes. (Según Christopher J. Ward y cols. Cell 77:883, 1994; cortesía de Peter C. Harris, con permiso de Cell Press.)

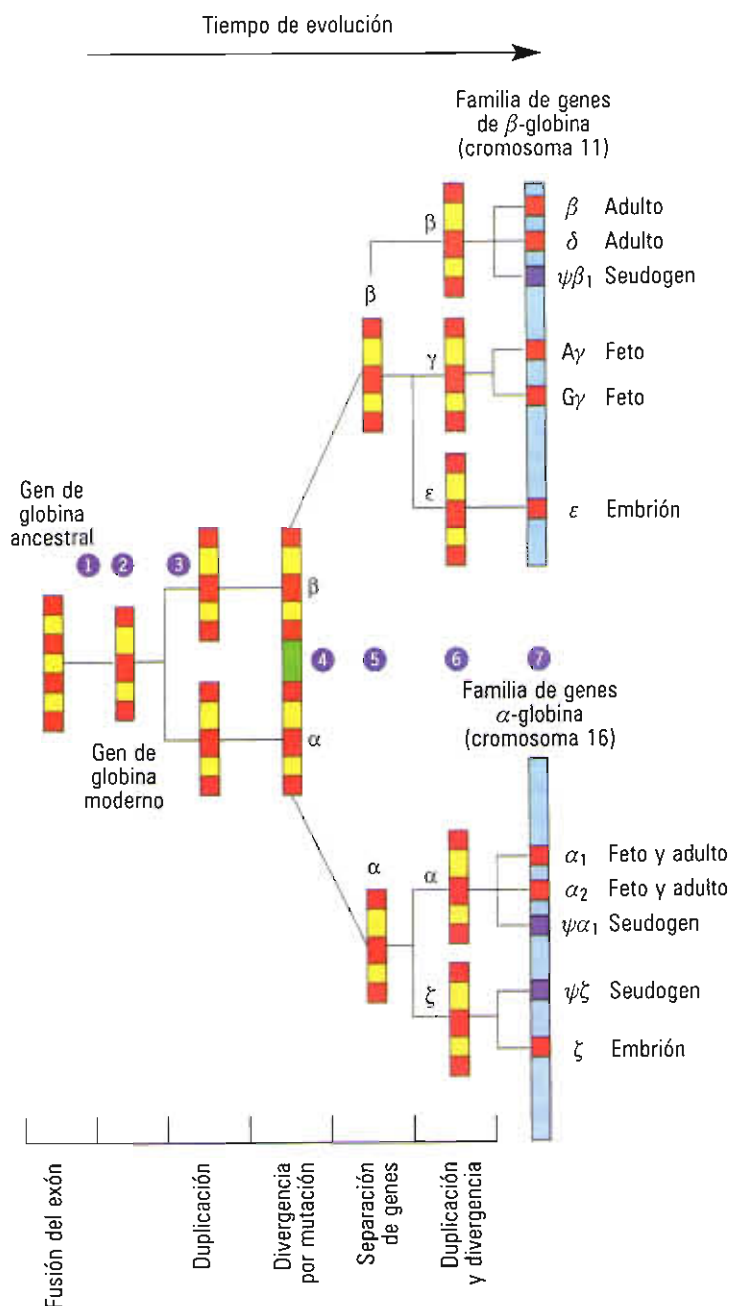


FIGURA 10-27. Vía para la evolución de los genes de globina. Los exones se muestran en rojo y los intrones en amarillo. Las etapas evolutivas mostradas en el diagrama se analizan en el texto. La disposición de los genes de globina α y β sobre los cromosomas humanos 16 y 11 (mostrados sin sus intrones de la derecha) es producto de varios cientos de millones de años de evolución.

Evolución de las secuencias de DNA en el laboratorio. Para estudiar en el laboratorio el proceso de cambio genético y evolución en especies elevadas, se necesitan organismos con plazo muy corto de generación y tamaño muy pequeño. Esta fue la razón para emplear la mosca de la fruta como sistema satisfactorio para análisis genéticos. Sin embargo, incluso este insecto es demasiado lento para reproducirse y de tamaño muy grande para permitir a los investigadores mantener el número necesario de individuos en el laboratorio para estudiar los principales cambios evolutivos del DNA. Por fortuna, se pueden efectuar algunos

análisis de este tipo en células cultivadas que pueden crecer aceleradamente y en gran número.

Las células cultivadas de mamífero pueden mostrar duplicación de genes con frecuencia sorprendentemente elevada. Esto se demostró por primera vez en cultivos de células de ratones y caballos en presencia de metotrexato, fármaco utilizado en la quimioterapia del cáncer. El metotrexato destruye células al enlazarse al sitio activo de una enzima esencial, la dihidrofolato reductasa (DHFR), e inactivarla. Se ha notado que el metotrexato a menudo es eficaz momentáneamente para reducir el tamaño de tumores malignos.

nos, pero luego pierde su eficacia. En cultivo de células tumorales el metotrexato puede generar resistencia similar al elevar gradualmente la concentración del fármaco a la cual se expone la célula. Este protocolo experimental consiste en cultivar células con metotrexato en concentración baja pero capaz de destruir todas las células, menos una por cada cien mil. Estas pocas células resistentes pueden entonces cultivarse con rapidez en gran número y ser tratadas con una concentración más alta del fármaco, el cual una vez más puede destruir casi todas las células pero seleccionar un pequeño número de ellas aún más resistentes que las que se permitió proliferar. El análisis de células capaces de desarrollarse en diferentes concentraciones de metotrexato indica que su resistencia regularmente corresponde a su contenido de DHFR; las células más resistentes son las que contienen unas 400 veces la cantidad de enzima en comparación con la inicial. El incremento del contenido de una enzima particular se puede explicar mediante varios mecanismos; en este caso se debe a la amplificación del gen que codifica la cadena del polipéptido de dihidrofolato reductasa. Estudios subsecuentes han indicado que las secuencias de DNA amplificado que codificaban para la enzima aparecían en un grupo pequeño de un cromosoma particular (fig. 10-28).

La evolución de la resistencia a metotrexato en células tumorales cultivadas es un ejemplo de amplificación *selectiva* del gen, puesto que otras partes del genoma no son afectadas, pero éste no es un caso de amplificación *programada*. Más bien, la secuencia de DNA que compone este gen particular se amplificó como resultado de un acontecimiento al *azar* dentro del genoma, como un entrecruzamiento desigual. Se puede asumir que hay probabilidades finitas pero raras de que determinado segmento del genoma “acciden-

talmente” se duplique en una célula dada, aunque algunas secuencias pueden ser más susceptibles de duplicación en comparación con otras debido a su ubicación dentro del cromosoma. Si la duplicación confiere mayor valor selectivo a la célula que la porta, como en la duplicación del gen de DHFR en presencia de metotrexato, entonces esa célula y su descendencia tendrán mayor probabilidad de sobrevivir y reproducirse.

Elementos genéticos móviles

Los estudios acerca de resistencia a fármacos en células tumorales cultivadas suministraron un notable ejemplo de cómo puede generarse un grupo de secuencias repetidas. Si consideramos las secuencias repetidas originadas en el curso normal de la evolución, encontramos que muchas de ellas ocurren en series, en tanto que otras se dispersan a través del genoma. Asumiendo que todos los miembros de una familia de secuencias repetidas se originaron de una sola copia, entonces ¿cómo pueden repartirse los miembros individuales entre cromosomas diferentes?

La primera persona que sugirió que los elementos genéticos eran capaces de mudarse de un sitio a otro en el genoma fue Barbara McClintock, genetista que trabajó con maíz en los Cold Spring Harbor Laboratories, en Nueva York. Los rasgos genéticos se expresan principalmente como cambios en patrones y marcas de las hojas y coloración de las mazorcas (fig. 10-29). A fines del decenio de 1940, McClintock observó que ciertas mutaciones eran muy inestables, aparecían y desaparecían de una generación a la siguiente, o incluso durante la vida de una planta indivi-



FIGURA 10-28. Demostración experimental de la amplificación del gen DHFR en células seleccionadas por exposición a metotrexato. Mediante hibridación *in situ* con fluorescencia empleando como sonda un gen de DHFR clonado de ratón se revela la localización de las secuencias DHFR del gen (mostradas en amarillo) en los cromosomas de este híbrido de ratón y cobayo. Se observa que el gen de DHFR está muy amplificado en ambos miembros del par de cromosomas homólogos sobre los cuales se encuentra el gen. (Cortesía de George B. Yeltatzie y Robert T. Schimke.)



FIGURA 10-29. Manifestaciones visibles de transposición en el maíz. Típicamente los granos de maíz son de color uniforme. Los puntos sobre este grano son resultado de la mutación de un gen que codifica una enzima participante en la producción de pigmentos. Las mutaciones de este tipo pueden ser muy inestables, y se originan o desaparecen durante el periodo de desarrollo de un solo grano. Estas mutaciones inestables aparecen y desaparecen como consecuencia del movimiento de elementos susceptibles de mudarse durante el periodo de desarrollo. (Cortesía de Venkatesan Sundaresan.)

dual. Luego de varios años de cuidadosos estudios concluyó que ciertos genes se movían de un sitio del cromosoma a otro totalmente diferente, afectando la expresión del gen. Denominó **transposición** a esta nueva disposición de los genes, y a los genes que mudaron de sitio los llamó **elementos transportables**. Entretanto, los biólogos moleculares que trabajaban con bacterias no encontraron pruebas de transposición. Para ellos, los genes parecían elementos estables situados en disposición lineal sobre el cromosoma que permanecían constantes de un individuo a otro y de una generación a la siguiente. Las publicaciones de McClintock fueron escritas en un estilo denso y difícil de entender, y se referían a un organismo cuya genética era muy compleja y poco familiar a otros investigadores prominentes. Como resultado, los datos de McClintock fueron ignorados.

A finales de los años 1960, varios laboratorios descubrieron que ciertas secuencias del DNA bacteriano podían mudarse de un sitio a otro del genoma. Estos elementos transportables se denominaron **transposones**. Subsecuentemente, se observó que los transposones codifican una proteína, o *transposasa*, que facilita su introducción al sitio específico del DNA. En la mayor parte de los casos, los elementos transportables de la bacteria no abandonan realmente el sitio donador; en vez de ello, se duplican y la copia del DNA resultante es introducida por la transposasa en un sitio específico distante. Análisis secuenciales de transposones indican que la secuencia presente en un extremo del elemento se repite en el extremo opuesto, pero con orientación opuesta (o sea, como una secuencia repetida, pero invertida) (fig. 10-30). Las transposasas reconocen estas repe-

ticiones terminales requeridas para integrarse al DNA específico. Se observan secuencias repetidas en los extremos de todo tipo de elemento transportable, tanto en bacterias como en eucariotes. Además, la integración del elemento genera un pequeño duplicado en el DNA específico que flanquea el elemento transpuesto en el sitio donde se introdujo (fig. 10-30). Los sitios específicos de duplicación sirven como "duplicados" para identificar sitios en el genoma que están ocupados por elementos transportables, o que ya han estado ocupados por ellos.

Como originalmente predijo McClintock, los estudios en genomas eucariotas han revelado la presencia de numerosos elementos transportables. Es muy improbable que un elemento transportable cambie de posición durante el periodo de vida de determinada célula, pero son tantas las copias presentes de ese elemento que su movimiento tiene enormes consecuencias en la evolución de los genomas.

Se cree que la introducción de elementos transportables ocurre al azar. Por consiguiente, un elemento tiene exactamente la misma probabilidad de introducirse en el centro de un gen que codifica proteína que en cualquier otra parte. En el hombre se han comprobado varios ejemplos de tales acontecimientos, incluyendo algunos casos de hemofilia causada por un elemento genético móvil que "salta" a la parte media de uno de los genes claves para codificar la coagulación sanguínea. Se estima que una de cada 500 mutaciones en el hombre son resultado de la introducción de un elemento transportable.

Se conocen varios tipos diferentes de elementos eucariotas transportables y también diversos mecanismos de transposición (fig. 10-31). Los mecanismos encargados de la transposición son complejos y poco comprendidos. Como en el caso de los transposones bacterianos descritos antes, algunos elementos eucariotas transportables se duplican y la copia del DNA se introduce en un sitio específico dejando el sitio donador sin cambios. En otros casos, el elemento se separa del DNA en el sitio donador y se introduce en un sitio específico distante. Sin embargo, con mayor frecuencia la transposición implica un RNA intermedio. El DNA del gen se transcribe al RNA, el cual entonces se "transcribe en reversa" a un DNA por medio de una transcriptasa inversa, enzima que emplea una molécula de RNA como plantilla para sintetizar una copia complementaria de DNA. La copia de DNA se elabora como una copia de doble cadena y luego se integra al sitio específico del DNA. En muchos casos, el elemento transportado lleva en sí la secuencia que codifica una transcriptasa inversa. Los elementos transportables que requieren transcriptasa inversa para mudarse se denominan **retrotransposones**. Casi todos los mecanismos de transposición implicados copian el elemento móvil en vez de seccionarlo, pero con el tiempo la transposición provoca aumento de tamaño del genoma.

Papel de los elementos genéticos móviles en la evolución

En la página 408 se mencionó que las secuencias de DNA moderadamente repetidas constituyen una porción significativa del genoma humano. Las dos familias más comunes de secuencias moderadamente repetidas en el DNA humano son elementos transportables; son las familias *Alu* y *L1*,

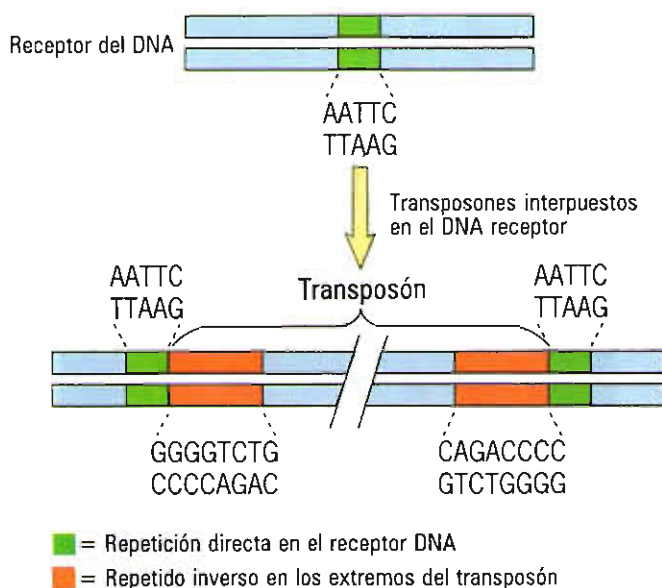


FIGURA 10-30. Organización de las secuencias de un transposón. Los extremos del elemento móvil transportable contienen secuencia inversa repetida. La integración del transposón al DNA del huésped genera una duplicación que se observa como unidad corta directa repetida en ambos extremos del elemento. Las secuencias de nucleótidos aquí mostradas pertenecen a Tn3, un transposón bacteriano que codifica tres proteínas, incluyendo la transposasa que le permite integrarse a nuevos sitios en el DNA.

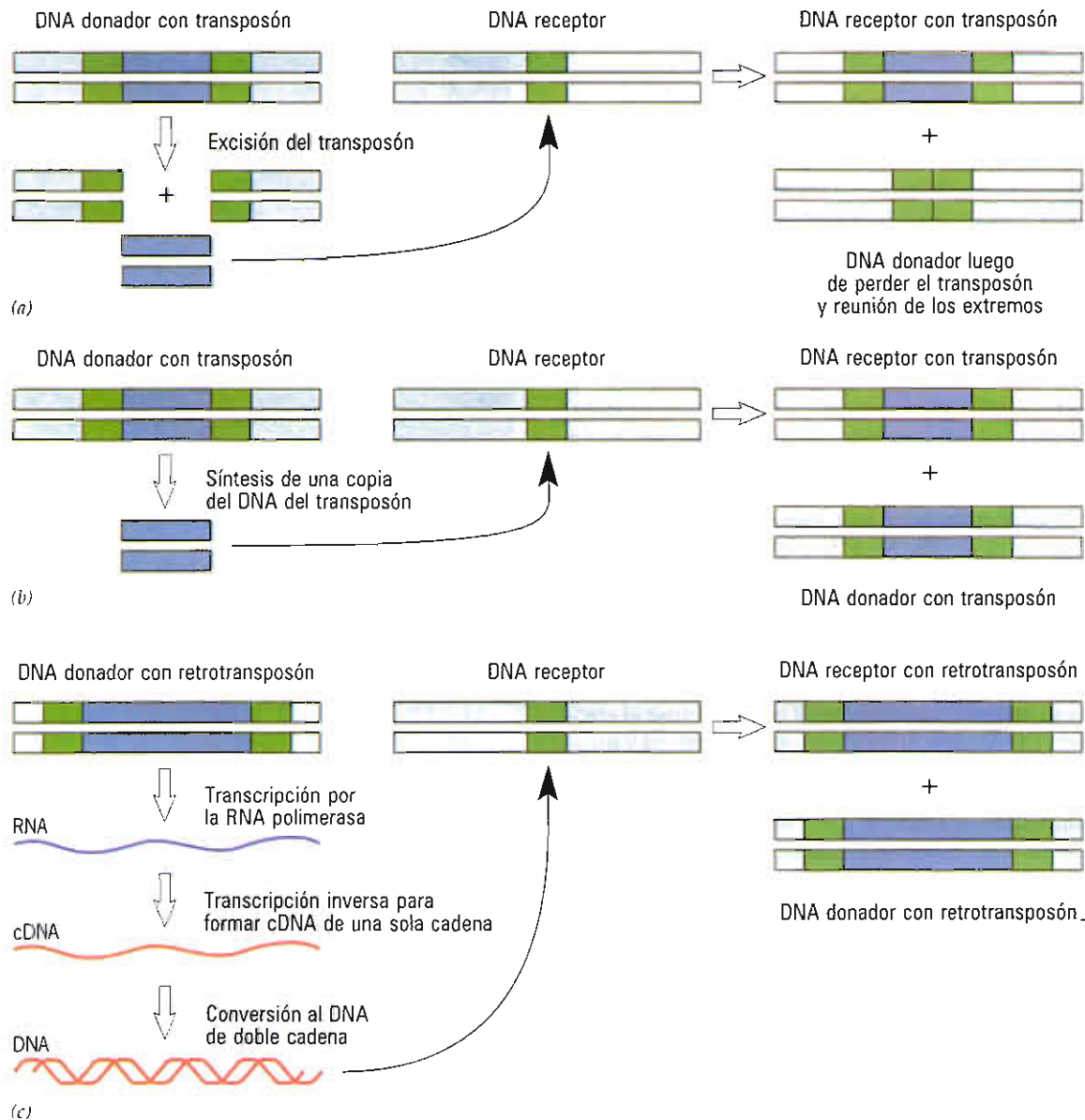


FIGURA 10-31. Tres vías alternativas para mover a los elementos transportables de un sitio a otro dentro del genoma. a) Transposición no replicativa; b) transposición replicativa, y c) transposición a través de un RNA intermedio. Esta última vía es prácticamente idéntica a la empleada por los retrovirus para introducir copias del DNA de su genoma en el DNA del huésped.

y se cree que ambas transponen por medio de RNA intermedio. La secuencia L1 tiene aproximadamente 6 000 pares de bases de longitud y equivale a casi 4% de todo el genoma humano. Esta secuencia contiene un segmento que codifica una transcriptasa inversa requerida para la transposición.

Aun más abundantes que las secuencias L1 son las secuencias *Alu*, interpuestas en cientos de miles de diferentes sitios a todo lo largo del cromosoma. *Alu* es una familia de secuencias cortas relacionadas y tiene casi 300 pares de bases de longitud. Puesto que las secuencias *Alu* constituyen más de 5% del genoma humano total, se podría esperar que esta secuencia se repita en genomas a través de todo el reino animal, pero este no es el caso. Estudios en genomas de

diferentes mamíferos indican que la secuencia *Alu* apareció primero como elemento transportable en el genoma de primates evolutivamente elevados hace casi 60 millones de años, y el número de copias fue creciendo a partir de entonces a una velocidad de casi una copia cada 100 años. Se estima que el miembro promedio de la familia *Alu* permaneció en el genoma de la línea evolutiva del ser humano durante casi 25 millones de años. Con los datos disponibles no se puede determinar si la amplificación está alcanzando un punto de "saturación" en el genoma o continúa sin impedimentos.

Cuando se descubre algo nuevo en un organismo, la primera pregunta que de ordinario se hace un biólogo es:

¿cuál es su función? Aún hay debate al respecto entre dos escuelas de pensamiento:

1. Un grupo argumenta que los elementos transportables no tienen función, más bien son un tipo de "parásito genético" que se puede propagar dentro del genoma huésped y transmitirse a la descendencia, en tanto no provoque efectos adversos graves en la capacidad del huésped para vivir y reproducirse.
2. Un segundo grupo argumenta que la transposición es un mecanismo clave para generar cambios genómicos que constituyen el impulso de la evolución biológica. Exploremos esta segunda proposición con mayor detalle.

Es claro, que el movimiento de un elemento transportable puede tener efectos nocivos sobre la expresión de un gen situado en el DNA específico. Sin embargo, en raras ocasiones se puede esperar que este movimiento sea benéfico y confiera al organismo una ventaja selectiva. En mayor escala, se ha sugerido que la transposición puede ser la causa de la aparición de nuevas especies (especiación). El examen del registro fósil llevó a la idea de que la especiación con frecuencia ocurre en cortos periodos seguidos por periodos más prolongados durante los cuales se observa muy poco cambio en las especies. Luego del descubrimiento en el laboratorio de genes con capacidad para suprimir el efecto mutacional de algunas transposiciones en ratones y moscas de la fruta, surgió una explicación para estos brotes evolutivos. Se sugiere que las mutaciones suprimidas pueden acumularse en el DNA de una población durante mucho tiempo sin ser expresadas. Luego, si el supresor fuera "súbitamente" inactivado, los cambios acumulados se manifestarían de golpe, provocando espectaculares diferencias en el fenotipo de dicho individuo y su progenie, lo que tal vez conduzca a la formación de una especie totalmente nueva.

Un punto queda claro: la transposición ha tenido mayor impacto en la alteración de la composición genética de los organismos conforme evolucionan. Esto puede ilustrarse claramente con el elemento P de *Drosophila melanogaster*. El examen de moscas de la fruta criadas en el laboratorio, descendientes de los individuos atrapados por T.H. Morgan y sus colegas a principios de siglo, muestra que se encuentran desprovistas del elemento P. En contraste, todo miembro de la especie capturado en el medio "silvestre" es portador de este elemento transportable (fig. 10-32). Se cree que este elemento fue introducido al genoma de una sola mosca de la fruta hace unos 50 años (quizá por transmisión de un individuo a otro de la especie *Drosophila*) y se propagó rápidamente a través de toda la población de las especies.

Es interesante notar que hace apenas veinte años los biólogos moleculares consideraban el genoma como depósito de información genética estable y susceptible de reposición. En la actualidad, es notable que los organismos puedan conservar su propia integridad de un día para otro frente a esta redistribución en gran escala del material genético. Por el descubrimiento de la transposición, Barbara McClintock fue la única ganadora del Premio Nobel en 1983, casi 35 años después de sus primeros descubrimientos.

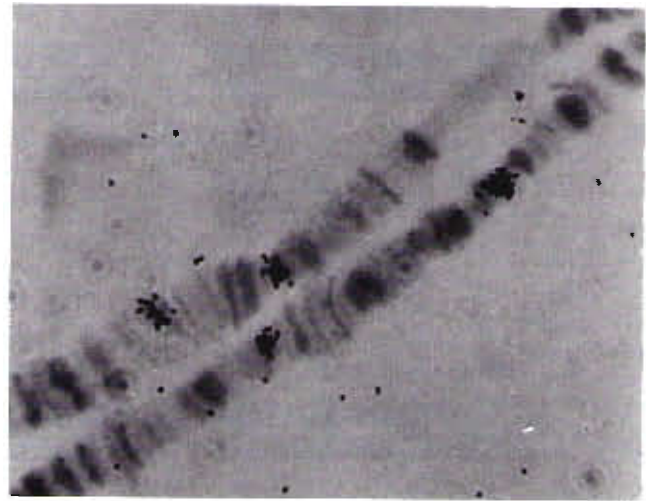


FIGURA 10-32. Elementos P en *Drosophila*. Porción de un par de homólogos politeno de *Drosophila* donde la localización de los elementos P está indicada por gránulos plateados en los sitios unidos al RNA complementario de la secuencia del elemento P transportable marcado con isótopo radiactivo. Se observa que el elemento P se introduce en diferentes sitios sobre los dos cromosomas homólogos. La introducción de un elemento P en uno de los sitios causó mutación en el gen que allí reside. (Según Kate Loughney, K. Kreber y Barry Ganetzky, Cell 58:1143, 1989; con permiso de Cell Press.)

10-5 Mapas moleculares del genoma

Durante decenios, los genetistas han determinado la frecuencia de entrecruzamiento de genes para elaborar mapas de éstos a lo largo de un cromosoma (pág. 394). Cuanto más cercanos se encuentran los genes sobre el cromosoma menor es la probabilidad de que sus alelos se separen durante el entrecruzamiento. Con este procedimiento de mapeo, los diferentes alelos de un gen actúan como *marcadores genéticos*, sirviendo como letreros que ayudan a revelar la ubicación relativa de otros sitios a lo largo del cromosoma. Se sabe que algunos genes presentan varias formas alélicas, como los que determinan el tipo sanguíneo, a los que se les denomina **genes polimórficos**, y constituyen los mejores marcadores genéticos debido a que los individuos pueden diferir de múltiples maneras. Asignar un marcador genético a la posición relativa en un cromosoma según la frecuencia de entrecruzamiento se conoce como **mapeo genético**. Pero, como se indica en la figura 10-33, los mapas genéticos no son la única manera de disecar un cromosoma.

Hay otro tipo de mapa cromosómico cuyo objetivo es determinar la secuencia de nucleótidos de DNA que constituyen cada cromosoma. Este tipo de mapa es el tema de *La perspectiva humana: Mapeo del genoma humano*. El medio para lograr este objetivo es disecar en fragmentos superpuestos de tamaño manejable la enorme molécula de DNA que constituye cada cromosoma. Estos fragmentos pueden clonarse y secuenciarse (sección 17-12) para determinar su orden en el cromosoma. Los mapas de este tipo elaborados con fragmentos de DNA en vez de marcadores genéticos se denominan **mapas físicos** (fig. 10-33). La construcción de

LA PERSPECTIVA HUMANA

Mapeo del genoma humano

En 1986, un grupo de científicos de todo el mundo se reunió en Cold Spring Harbor Laboratories, de Long Island, Nueva York, para analizar la posibilidad de descodificar toda la información genética almacenada en los cromosomas humanos, mediante una colaboración científica internacional de grandes proporciones. En pocos años, las dependencias gubernamentales de Estados Unidos, Europa y Japón decidieron unirse a este esfuerzo, conociendo como PGH, Proyecto del Genoma Humano. El término "genoma" se refiere a la información almacenada en todo el DNA de un solo conjunto de cromosomas. El genoma humano contiene unos 3 000 millones de pares de bases. ¡Si cada letra de esta página fuera equivalente a un par de bases del DNA, la información contenida en el genoma humano sería suficiente para un libro de un millón de páginas, aproximadamente!

El objetivo del Proyecto del Genoma Humano es conocer la secuencia del DNA de los 24 cromosomas humanos (22 autosomas más los cromosomas X y Y que determinan el sexo) hacia el año 2005. Se establecieron centros comprometidos a lograr este objetivo en todo el territorio de Estados Unidos y en otros países. Durante los primeros años del proyecto, los investigadores prepararon mapas físicos de cada cromosoma humano con el fin de obtener, para el año 1998, marcadores identificables de secuencias localizadas cada 100 000 bases. También se aislaron fragmentos superpuestos de DNA dispuestos en un orden para cubrir toda la longitud de cada cromosoma.

Además del genoma humano, el proyecto también incluye secuenciar el genoma de varios organismos "modelo", incluyendo bacterias, levaduras, nematodos, la mosca de la fruta y el ratón. El genoma completo de una levadura (14 millones de pares de bases divididas en 16 cromosomas) debió

estar secuenciado para fines de 1996, el cual sería el primer eucariote cuya plantilla genética se conociera en su totalidad. Conforme se descubran secuencias y localizaciones de diferentes genes de la levadura, se tratará de determinar sus funciones. Puesto que el genoma humano posee homólogos de casi todos los genes de la levadura, esta información podrá relacionarse directamente con el proyecto humano.

El costo total del Proyecto del Genoma Humano se estima en casi 3 000 millones de dólares: un dólar por cada par de bases. ¿Para qué gastar tanto dinero y esfuerzo simplemente para determinar una lista de nucleótidos de cuatro letras que pueden llenar un millón de páginas? El objetivo del proyecto no sólo es compilar una secuencia de letras, sino conocer el significado de dicha secuencia. Con el Proyecto del Genoma Humano se espera:

- Revelar la secuencia de aminoácidos de cada polipéptido codificado por nuestros genes. Mediante el análisis de las secuencias, los biólogos podrán entonces conocer la función probable de estos polipéptidos. Esta información puede arrojar luz sobre casi todos los aspectos de la biología humana, desde las bases bioquímicas de la memoria hasta los productos del gen que provocan pérdida de control del crecimiento celular, con la consiguiente malignidad. Se estima que el genoma humano contiene alrededor de 100 000 genes distintos.
- Obtener información detallada acerca de las secuencias que participan en el control de la expresión del gen.
- Identificar los genes que causan enfermedades humanas o que contribuyen a ellas, incluyendo enfermedades tan complejas como cáncer, hipertensión, enfermedad de

Alzheimer y enfermedades mentales, y determinar los cambios en la secuencia que desencadenan la enfermedad.

- Lograr conocimientos acerca de la evolución a nivel molecular al comparar nucleótidos y secuencias de aminoácidos en el hombre con los de sus parientes evolutivos cada vez más distantes. Los estudios de este tipo también revelarán los productos del gen característicos del hombre, lo que ayudará a explicar por qué somos biológicamente diferentes de otros organismos.
- Permitir a los investigadores obtener cualquier gen particular en muestras de DNA, y por lo tanto tener una oportunidad ilimitada de continuar la investigación en biología molecular humana.
- Suministrar a los biotecnólogos la oportunidad de elaborar proteínas humanas previamente desconocidas con valor potencial en medicina.

El Proyecto del Genoma Humano no está exento de críticas. Algunos científicos opinan que el proyecto es demasiado costoso, al menos a nuestro nivel actual de experiencia en la secuenciación de DNA, y que consume dinero de otros proyectos de investigación. Además, casi todo el trabajo es tedioso y falto de creatividad, no del tipo de proyecto atractivo para la mayoría de los científicos. Sidney Brenner, uno de los pioneros de la biología molecular inglesa, irónicamente sugirió que este sería un trabajo adecuado para castigar convictos de una colonia penal. Otros críticos argumentan que el conocimiento de las secuencias del DNA humano abre la puerta a una nueva invasión de nuestra intimidad. Por ejemplo, es factible que compañías de seguros o empresas que ofrezcan empleos demanden información acer-

ca de la constitución genética de posibles empleados o asegurados para determinar su predisposición hacia enfermedades particulares. Todavía más, otros temen que el conocimiento acerca de las secuencias de nucleótidos

determinantes de ciertas características genéticas conduzca a que gobiernos inescrupulosos intenten alterar el genoma humano en cierta dirección particular. Para contrarrestar estos temores, el director del Proyecto del Ge-

noma Humano subraya con gran énfasis las implicaciones éticas, sociales y legales de una amplia disponibilidad de información relativa a las secuencias genéticas.

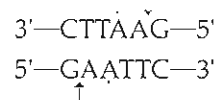
un mapa físico se inicia con la disección del DNA, lo que se logra empleando endonucleasas de restricción.

Endonucleasas de restricción

Durante el decenio de 1970 se observó que las bacterias contienen nucleasas capaces de reconocer secuencias cortas de nucleótidos en el DNA doble y desdoblar el esqueleto

principal de la molécula en sitios muy específicos sobre ambas cadenas del doblete. Estas enzimas recibieron el nombre de **endonucleasas de restricción**, o simplemente **enzimas de restricción**. La denominación se debe a que las bacterias las emplean para destruir el DNA viral capaz de penetrar a la célula, y por lo tanto *restringen* el potencial de crecimiento de los virus. El propio DNA de la bacteria se encuentra protegido de ataques nucleolíticos por metilación de los sitios susceptibles sobre las bases, modificación química que impide la acción de la enzima.

Se han aislado enzimas de varios cientos de organismos procariotas diferentes que, en conjunto, reconocen más de 100 distintas secuencias de nucleótidos. Las secuencias reconocidas por estas enzimas son de cuatro a ocho nucleótidos de largo y se caracterizan por un tipo particular de simetría interna. Consideremos la secuencia particular reconocida por la enzima *EcoRI* (fig. 10-34):



Se dice que este segmento posee *simetría rotacional doble* porque puede girar 180° sin cambiar la secuencia de bases. Por lo tanto, si uno lee la secuencia en la misma dirección (3' a 5' o 5' a 3') sobre cada cadena, se observa el mismo orden de bases. Una secuencia con este tipo de simetría se denomina *palindromo*. Cuando la enzima *EcoRI* ataca este palindromo, rompe cada cadena sobre el mismo sitio *en la secuencia*, indicado por las flechas entre los residuos A y G. Los puntos mostrados sobre la parte de arriba del segmento indican las bases de esta secuencia que son metiladas para proteger el DNA huésped del ataque enzimático. En la figura 10-35 se muestran las secuencias reconocidas por algunas enzimas de restricción. Algunas de estas enzimas desdoblan los enlaces directamente opuestos entre sí sobre las dos cadenas, lo que produce extremos al mismo nivel, en tanto que otras, como la *EcoRI*, ejecutan cortes biselados.

El descubrimiento y purificación de las enzimas de restricción constituye uno de los avances más valiosos efectuados por los biólogos moleculares en años recientes. La secuencia particular de cuatro a seis nucleótidos es muy frecuente sólo por azar, por lo que cualquier tipo de DNA puede ser fragmentado por estas enzimas. El empleo de las enzimas de restricción permite disecar con precisión el DNA del genoma humano, o de cualquier otro organismo, en un

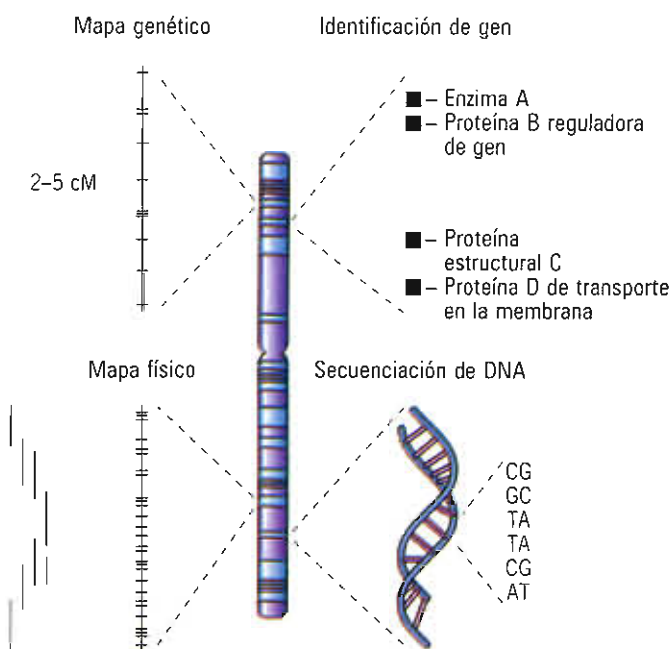


FIGURA 10-33. Tipos de información obtenida por análisis genético. Los mapas genéticos suministran información acerca de la posición relativa de los marcadores genéticos determinada por la frecuencia de recombinación. Los mapas físicos se construyen por superposición de fragmentos DNA obtenidos por digestión con enzimas de restricción. La identificación de genes se ha convertido en una investigación clínica muy importante conforme se incrementa el número de genes identificados como causantes de enfermedades en el hombre. El secuenciamiento de DNA proporciona información acerca de la secuencia de pares de bases que constituyen regiones específicas de los cromosomas. Como se analiza en *La perspectiva humana* de la página 417, los investigadores tienen como meta secuenciar todo el genoma humano para el año 2005. (Según F.S. Collins Science 262:45, 1993. Copyright 1993 por American Association for the Advancement of Science.)

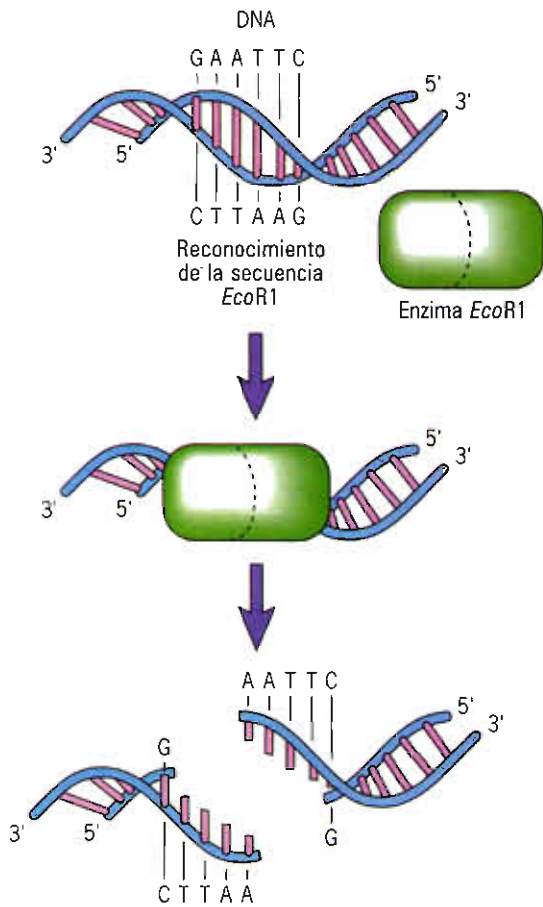


FIGURA 10-34. Separación del DNA mediante la enzima de restricción *EcoRI*.

conjunto definido de fragmentos específicos. Una vez digerido el DNA de un individuo particular con una de estas enzimas, los fragmentos generados se pueden fraccionar en tramos de longitud definida mediante electroforesis en gel (fig. 10-36, *a*). Diferentes enzimas desdoblan una misma preparación de DNA en distintos conjuntos de fragmentos, y los sitios desdoblados dentro del genoma por las diferentes enzimas se pueden identificar y ordenar en un **mapa de restricción** (una especie de mapa físico), como el mostrado en la figura 10-36, *b*. Dada su capacidad para fragmentar el DNA en un conjunto predecible de fragmentos, las enzimas de restricción tienen aplicación en gran número de actividades humanas, incluyendo diagnóstico médico y peritajes en medicina forense. En las siguientes páginas se describen las bases de estas aplicaciones.

Síntesis y empleo del polimorfismo por restricción de la longitud de fragmentos

Los fragmentos de restricción generados por el DNA de determinada persona después de ser tratada con una o más enzimas de restricción forman un conjunto bien definido de fragmentos. Si se trata el DNA de diversas personas (in-

Enzima	Reconocimiento de la secuencia	Enzima	Reconocimiento de la secuencia
R. HindII	3'-N-C-A-R-Y-T-G-N-5' 5'-N-G-T-Y-R-A-C-N-3'	R. EcoRI	3'-N-C-T-T-A-A-G-N-5' 5'-N-G-A-A-T-T-C-N-3'
R. BsuR	3'-N-N-C-C-G-G-N-N-5' 5'-N-N-G-G-C-C-N-N-3'	R. EcoRII	3'-N-N-G-G-C-C-N-N-5' 5'-N-N-C-C-G-G-N-N-3'
R. HpaII	3'-N-C-A-A-T-T-G-N-5' 5'-N-G-T-T-A-A-C-N-3'	R. HindIII	3'-N-T-T-C-G-A-A-N-5' 5'-N-A-A-G-C-T-T-N-3'

FIGURA 10-35. La mayor parte de las enzimas de restricción separan las moléculas de la doble cadena de DNA por secuencias de cuatro a seis nucleótidos específicos. Se ilustran las secuencias reconocidas por varias de estas enzimas junto con el sitio sobre cada cadena donde se efectúa el corte (indicado por las flechas). Las enzimas situadas a la izquierda rompen ambas cadenas en un mismo punto, en tanto que las situadas a la derecha rompen la cadena en sitios escalonados. N es cualquier nucleótido (el nucleótido opuesto debe ser complementario), R es una purina, Y una pirimidina. La línea punteada central indica el punto de doble simetría de rotación. (Reimpreso según K. Murray, *Endeavour* 35:130, 1976, con el amable permiso de Elsevier Science Ltd.)

cluso gemelos no idénticos) con una enzima de restricción, el patrón electroforético de los fragmentos es similar, pero no idéntico, debido a diferencias en la secuencia de nucleótidos de una persona a otra. La mayor parte de estas diferencias en la población humana se pueden relacionar con la presencia de secuencias cortas repetidas, adyacentes entre sí en grupos en vastos tramos dentro de los genes. Los recuadros en color de la figura 10-37, *a*, muestran uno de estos grupos de secuencias repetidas. En esa ilustración, las dos moléculas de DNA representan partes comparables de dos cromosomas homólogos de un hombre y una mujer, y dos de sus hijas (fig. 10-37, *b*). Nótese que el número de las secuencias repetidas (indicadas por los recuadros) sobre las dos moléculas de DNA es distinto. Diferencias de este tipo son muy comunes, y en realidad explican gran parte de las variaciones genéticas en la población humana. Al parecer, estas diferencias no desempeñan función biológica alguna, pero son muy valiosas como marcadores para localizar genes humanos e identificar individuos humanos.

En el ejemplo ilustrado en la figura 10-37, *a*, los segmentos correspondientes de DNA localizados en dos cromosomas homólogos se desdoblan en fragmentos de diferente tamaño debido a diferencias en el número de veces que se repite una pequeña secuencia. A estas diferencias se les llama **polimorfismo por restricción de la longitud de fragmentos** (PRLF), o simplemente "riflips". Los PRLF producen diferencias notables en el patrón de bandas de la electroforesis (fig. 10-37, *c*), que puede usarse para identificar individuos mediante técnicas dactiloscópicas de DNA (fig. 10-23) o trazar la herencia de genes particulares.

En 1979, Ray White y Arlene Wyman, de la Universidad de Massachusetts, identificaron el primer PRLF (fig. 10-37, *d*) en un estudio del DNA de miembros de una vasta familia mormona elegida por sus relaciones genealógicas

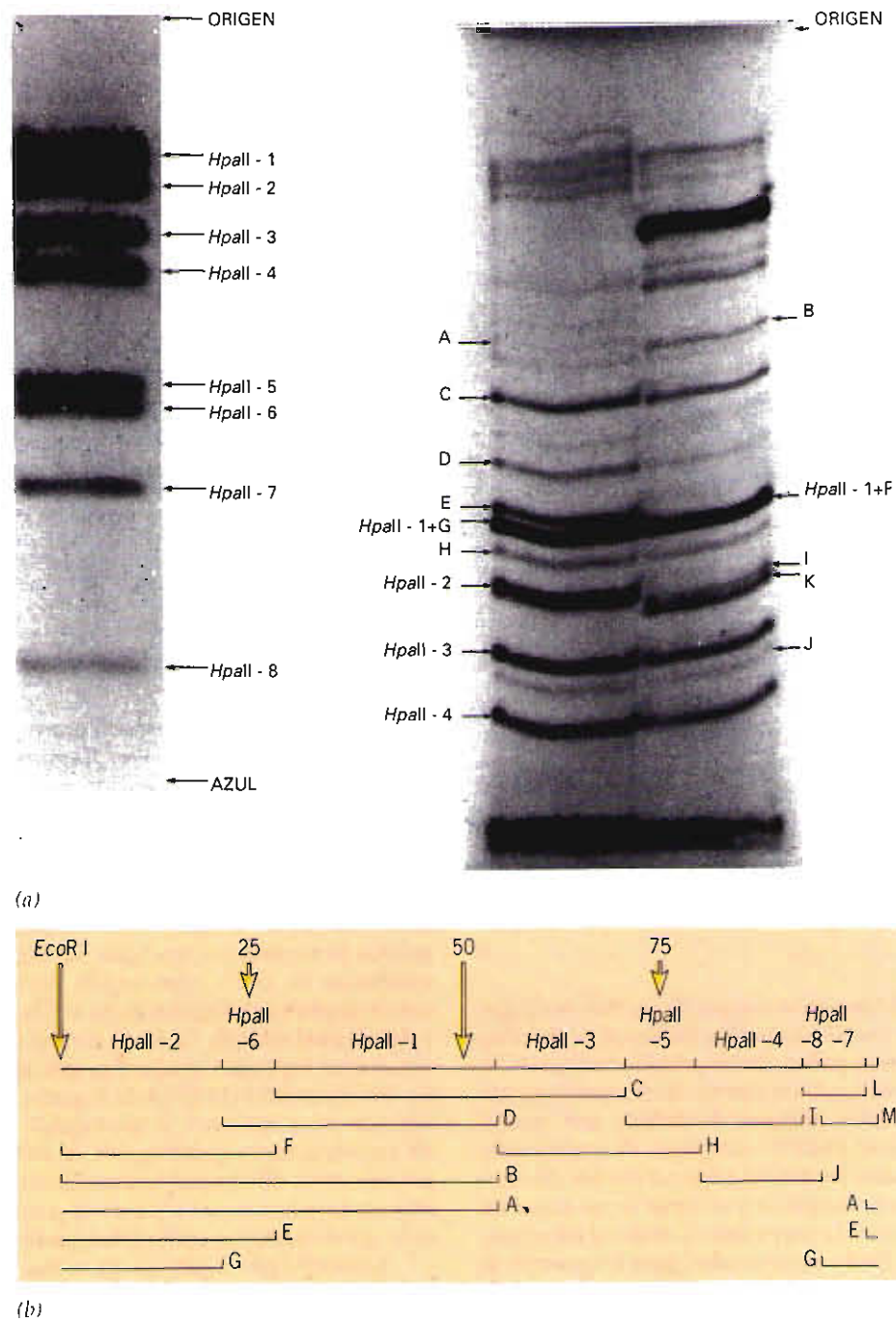


FIGURA 10-36. Construcción de un mapa de restricción del genoma circular pequeño del DNA del virus tumoral polioma. *a)* Autorradiografías de fragmentos de DNA marcados con ^{32}P sometidos a electroforesis en gel. El gel de la izquierda muestra el patrón de fragmentos de DNA obtenido después de digestión completa del genoma del polioma con la enzima *HpaII*. Para determinar cómo se reúnen estos ocho fragmentos en el genoma intacto es necesario tratar el DNA para generar fragmentos superpuestos. La superposición de fragmentos se puede producir tratando el genoma intacto con una segunda enzima que desdoble la molécula en diferentes sitios o tratándolo con la misma enzima en condiciones donde el DNA sea completamente digerido, como se hizo con el gel de la izquierda. Los dos gels de la derecha representan ejemplos de genoma del polioma parcialmente digerido con *HpaII*. El gel de enmedio muestra fragmentos generados por digestión parcial de la superhélice de DNA circular y el gel de la derecha muestra los fragmentos *HpaII* formados luego de convertir el genoma circular en una molécula lineal mediante *EcoRI* (una enzima que sólo efectúa un corte en el círculo). *b)* Mapa de restricción del genoma de polioma linealizado con base en el desdoblamiento mediante *HpaII*. En la parte de arriba se muestran los ocho fragmentos procedentes de la digestión completa a lo largo del DNA. Debajo del mapa se muestran en disposición ordenado los fragmentos superpuestos de la digestión parcial. (Según Beverly E. Griffin, Mike Fried y Alison Cowie, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71:2078, 1974.)

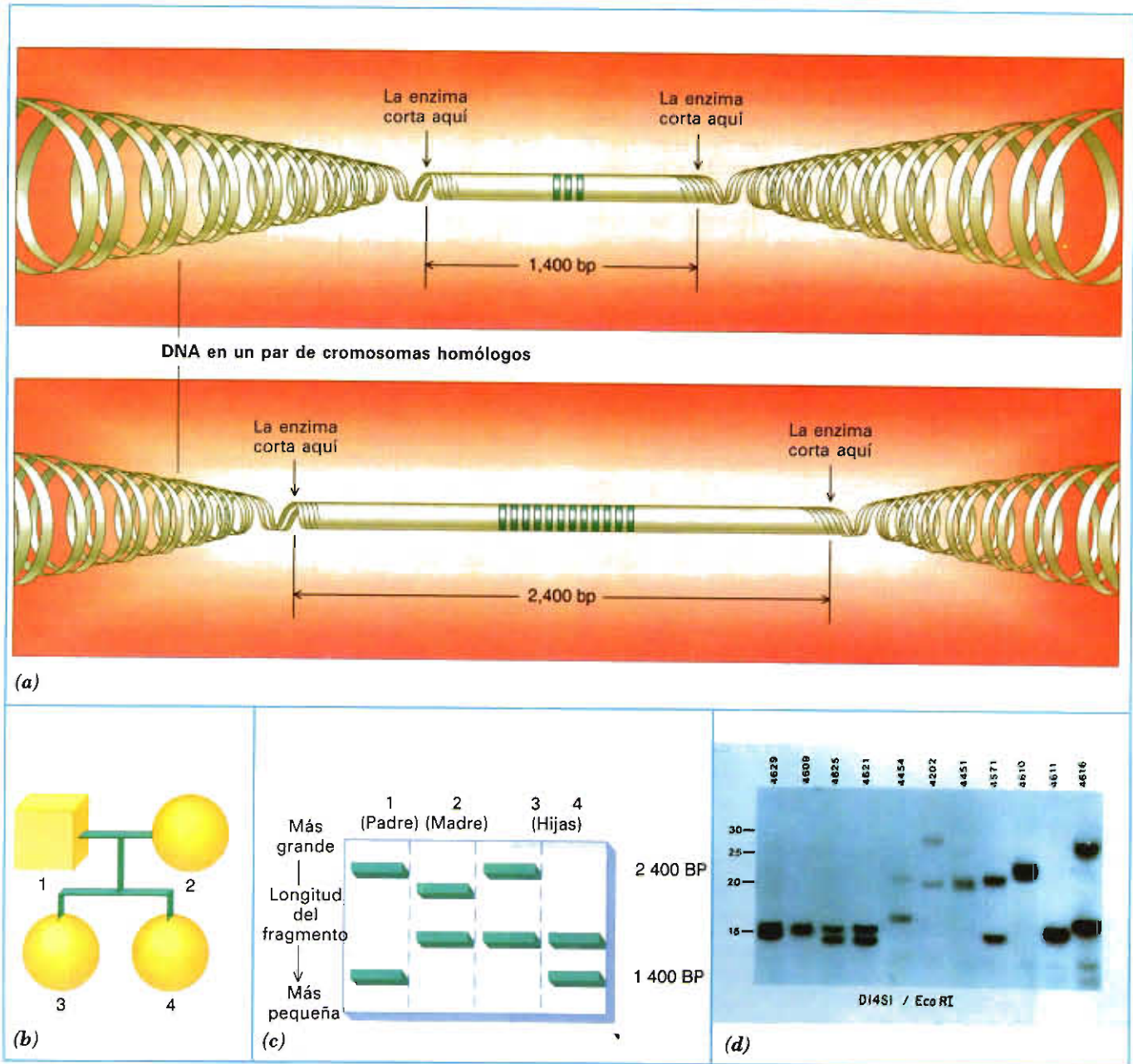


FIGURA 10-37. Polimorfismo por restricción de la longitud de fragmentos (PRLF). *a)* Segmentos homólogos de DNA procedentes de un par de cromosomas homólogos de un individuo. Las flechas representan sitios en el DNA atacados por una enzima de restricción particular. Los recuadros en color denotan secuencias cortas repetidas del DNA. En este ejemplo, el DNA situado sobre un cromosoma tiene tres secuencias repetidas y el DNA sobre el cromosoma homólogo posee 12. Cuando se tratan estas dos moléculas de DNA con la enzima de restricción, una produce fragmentos con 2 400 pares de bases, en tanto que la otra produce fragmentos con 1 400 pares de bases. Este es un ejemplo de polimorfismo por restricción de la longitud de fragmentos (PRLF). *b)* Breve genealogía de cuatro miembros de la familia: un padre, una madre y sus dos hijas. El DNA del padre se muestra en la parte *a*. *c)* Patrón de los fragmentos de DNA de los cuatro miembros de la familia. Cada fila (correspondiente a diferente persona) muestra dos bandas: una por cada cromosoma homólogo. Las dos bandas en la fila 1 identifican el DNA del padre de la parte *a*. Los fragmentos del DNA de la madre son diferentes de los del padre, lo que refleja diferencias en la secuencia de nucleótidos de DNA. Cada una de las hijas hereda un cromosoma de su madre y uno de su padre, generando los patrones observados en las filas 3 y 4. *d)* Primera demostración de que se puede usar PRLF en busca de diferencias genéticas en una población humana. El número arriba de cada fila denota un individuo particular. Nótese las marcadas diferencias entre los patrones de bandas. Las filas que sólo tienen una banda densa son de individuos cuyos dos fragmentos homólogos son: 1) bandas de tamaño bastante similar, de modo que se mezclan en una sola banda más gruesa, o 2) homocigotos para este PRLF particular, de modo que ambos homólogos producen fragmentos del mismo tamaño. (*d*: Según Arlene Wyman y Ray White, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 67:6754, 1980.)

bien definidas. Cuando el DNA de 56 personas del grupo estudiado se sometió a digestión por la misma enzima restrictiva, la sonda marcada identificó fragmentos de 30 tamaños diferentes dentro de la población. Puesto que la longitud de los fragmentos de restricción se hereda según las leyes mendelianas de igual manera que la forma de las semillas en plantas o el tipo sanguíneo en el hombre, el polimorfismo en la longitud de los fragmentos equivale a encontrar 30 diferentes alelos para un gen entre 56 individuos relacionados. Para ilustrar cómo se puede emplear este tipo de variabilidad en el mapeo de genes, describiremos el uso de los PRLF para localizar el gen que causa la fibrosis quística.

Localización del gen causante de fibrosis quística

Como se estudió en la página 152, la fibrosis quística (FQ) es una enfermedad hereditaria cuyas víctimas sufren trastornos respiratorios crónicos debido a la producción de moco viscoso y duro en las células que revisten las vías respiratorias. El objetivo de los investigadores en la búsqueda del gen de la fibrosis quística era encontrar un PRLF muy próximo a dicho gen. ¿Cómo sabría el mapeador si había identificado dicho PRLF? Recordemos que es muy poco probable que dos genes localizados muy cerca sobre un cromosoma se separen durante el entrecruzamiento. Por consiguiente, si un PRLF particular y el gen de la FQ están muy próximos, entonces todos los individuos de una familia afectados por la enfermedad probablemente posean la misma versión del marcador del PRLF (fig. 10-38). Otras familias que padecen la enfermedad pueden tener versiones diferentes de polimorfismo por restricción de la longitud de fragmentos.

Si un investigador encuentra un PRLF invariablemente presente en los miembros de una familia con la enfermedad, entonces puede deducir que el PRLF está próximo al gen que causa la enfermedad. En otras palabras, el PRLF sirve como marcador genético para localizar genes cuya posición sería indetectable de otra manera. Una vez identificado el PRLF que reside dentro del millón de nucleótidos, aproximadamente, del gen de la FQ, los investigadores emplearon otras técnicas para desplazar el PRLF hacia las regiones adyacentes del DNA hasta llevarlo al propio gen de la fibrosis quística.

Según se vio en la página 153, el aislamiento del gen de la fibrosis quística condujo a caracterizar la proteína codificada por el gen, a desarrollar un método para diagnosticar FQ en un feto mediante estudios de detección del DNA fetal y una estrategia para corregir el defecto a través de geneterapia. Los prospectos para geneterapia se consideran con mayor detalle en *La perspectiva humana* de este capítulo. En los últimos años, se aislaron algunos otros genes causantes de enfermedades, incluyendo los genes que provocan enfermedad de Huntington, síndrome de cromosoma X frágil, distrofia muscular y varios genes que predisponen al individuo a diferentes formas de cáncer común. Se han desarrollado nuevas técnicas para acelerar el aislamiento de genes que desempeñan algún papel en enfermedades complejas, como cáncer, diabetes, enfermedad cardiovascular y esquizofrenia. Se tienen fundadas esperanzas de que, como en la fibrosis quística, el conocimiento de las bases genéticas de estas enfermedades suministren la base para nuevos tratamientos más eficaces.

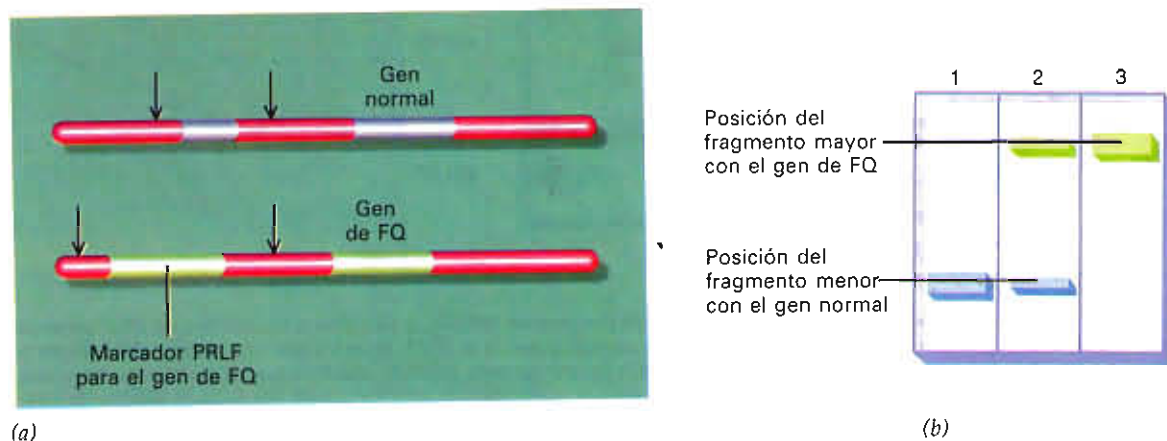


FIGURA 10-38. Unión de los genes de la fibrosis quística con un marcador genético. a) El DNA de un portador heterocigoto de fibrosis quística (FQ) tiene un alelo normal y un alelo mutante. Los dos alelos, localizados sobre cromosomas homólogos, inevitablemente se unen a fragmentos de restricción de diferente tamaño. En este hipotético ejemplo, el gen de la FQ está íntimamente ligado al marcador de PRLF, de color verde. En este caso, cualquier miembro de la familia que porta el alelo FQ tiene mucha probabilidad de poseer el fragmento de restricción más largo. Una vez que se encuentra un marcador cercano, como el PRLF de color verde mostrado en a, los investigadores pueden trazar un camino desde el marcador hasta el gen buscado. b) Supongamos que dos heterocigotos con los mismos homólogos mostrados en a tuvieron dos hijos. Sería de esperar que los hijos presentaran tres patrones diferentes de fragmentos de restricción. La línea uno muestra el DNA de un hijo homocigoto normal y por lo tanto tiene dos copias del fragmento más pequeño; la fila dos es de un niño heterocigoto que tiene un fragmento largo y uno corto y será portador, igual que los padres; y la fila tres es la de un niño que sufre de la enfermedad y tendrá dos copias del fragmento más largo.

LA PERSPECTIVA HUMANA

Corrección de trastornos genéticos mediante geneterapia

En el decenio de 1970, un joven llamado David captó la atención de la sociedad estadounidense como "el niño de la burbuja de plástico". La burbuja era un ambiente estéril aislado donde el joven vivió casi toda su vida. Requería ese extraordinario nivel de protección porque nació con un padecimiento hereditario muy raro llamado *enfermedad por inmunodeficiencia combinada grave* (EICG), a causa de la cual prácticamente carecía de sistema inmunológico. La burbuja protegía a David contra virus y bacterias que podían provocarle infecciones mortales, pero también lo mantuvo aislado de todo contacto físico directo con el mundo exterior, incluyendo sus padres. En casi 25% de los casos, la EICG se debe a la ausencia hereditaria de una sola enzima, adenosina desaminasa (ADA), que cataliza una reacción en la vía catabólica de la descomposición de purinas. En ausencia de esta enzima, el sustrato normal de la misma (desoxiadensina) se acumula hasta alcanzar concentraciones tóxicas que matan a ciertas células sensibles, incluyendo linfocitos T encargados de la inmunidad mediada por células.

La **geneterapia** es el proceso para curar a un paciente alterando su genotipo. Por varias razones, la EICG es excelente candidato para geneterapia. Primero, no hay cura para la enfermedad e invariablemente provoca la muerte en edad temprana. Segundo, la EICG es consecuencia de alteraciones de un gen específico ya aislado y clonado, y por lo tanto disponible para emplear en el tratamiento. Por último, las células que normalmente expresan el gen ADA son un tipo de leucocitos fáciles de eliminar del paciente, de cultivar *in vitro*, de modificar genéticamente y luego de reintroducir al paciente mediante transfusión.

En 1990, una niña de cuatro años de edad afectada por EICG fue la primera persona autorizada por los Na-

tional Institutes of Health y la Food and Drug Administration de Estados Unidos para recibir geneterapia. En septiembre de 1990 se le administró una transfusión de sus propios leucocitos portadores de copias normales del gen ADA gracias a modificaciones genéticas. La expectativa fue que los leucocitos modificados proporcionaran a la niña las armas necesarias para liberarse de infecciones en el futuro. Los leucocitos tienen un periodo de vida limitado, por lo que el procedimiento debía repetirse periódicamente para conservar la capacidad inmunológica de la paciente. En el momento de escribir esto, la niña y otro niño incluido más tarde en el programa se encuentran bien. Los resultados de esta primera aventura en el campo de la geneterapia indican que el tratamiento tuvo éxito.

En la actualidad, los mayores esfuerzos están enfocados a desarrollar más técnicas para introducir genes extraños en las células. Los leucocitos inyectados de regreso a los niños afectados por EICG fueron manipulados mediante ingeniería genética infectando las células con un retrovirus portador del gen ADA humano normal. El virus se desactivó genéticamente para suprimirle su capacidad de duplicación y producir una progenie viral. Sin embargo, todavía es capaz de integrar su genoma (y el gen ADA extra que porta) al DNA de la célula huésped donde dicho gen puede ser la base de operaciones para producir la enzima requerida. La capacidad de los retrovirus para integrarse al genoma los hace excelentes vectores en experimentos de geneterapia. Pero el empleo de retrovirus entraña ciertos riesgos. Por ejemplo, la integración del retrovirus dentro del genoma ocurre al azar, y por lo tanto siempre hay la posibilidad remota de que el virus se integre a un sitio del genoma donde active un oncogen productor de cáncer y entonces malignizar células susceptibles. Además,

los retrovirus sólo pueden integrar sus genes a una célula en etapa de división activa, lo que excluye su empleo en células que no se dividen, como neuronas y células musculares. Algunos estudios, como el de fibrosis quística descrito en la página 153, se realizaron utilizando adenovirus como vector del gen. El adenovirus no integra su genoma al DNA de la célula huésped, por lo que no puede activar oncogenes, pero sí puede emplearse para infectar células fuera de su etapa de división. Los adenovirus también tienen desventajas, incluyendo una tendencia a separarse de la célula huésped infectada.

Los virus no son la única vía para introducir DNA a las células. Se puede lograr que las células capten DNA de su ambiente (procedimiento denominado *transfección*) mediante la aplicación de choques eléctricos, o fusionarlas con un liposoma (pág. 122) donde se encuentra encapsulado el DNA; estas técnicas no son tan eficaces como el empleo de vectores virales, pero algunos científicos las consideran más seguras y su eficiencia puede incrementarse combinándolas con otras técnicas. Por ejemplo, el gen introducido a la célula puede unirse a un gen resistente a fármacos. A continuación, cuando las células crecen en un medio que contiene el fármaco, sólo las que captaron el DNA pueden crecer y proliferar, eliminando así a las células que carecen del gen extraño.

Cuando se consideró por primera vez la geneterapia como una posibilidad factible, los prospectos obvios para tratamiento fueron enfermedades hereditarias, como EICG, fibrosis quística e hipercolesterolemia familiar (pág. 316), puesto que todas estas enfermedades podían corregirse introduciendo un gen normal en las células de tejidos y órganos afectados. En realidad, estas tres enfermedades congénitas son motivo de ensayos clínicos promiso-

rios. Pero el enfoque de la geneterapia ha cambiado de estas enfermedades relativamente raras, causadas por defectos en un solo gen, a enfermedades más comunes, de bases más complejas, incluyendo cáncer y padecimientos cardiovasculares. Veamos cómo se puede aplicar la geneterapia a estas dos enfermedades. En *La perspectiva humana* del siguiente capítulo se analiza un plan para emplear geneterapia en el tratamiento del SIDA.

CANCER

Durante varios decenios, los investigadores clínicos intentaron aplicar los conocimientos logrados en investigaciones de biología molecular al tratamiento del cáncer. Infortunadamente, este esfuerzo ha tenido poco éxito. En la actualidad, con el advenimiento de la geneterapia se han aprobado nuevos protocolos de ensayos clínicos y la comunidad científica espera mejores resultados. El examen de uno de estos protocolos servirá para ilustrar las posibilidades.

El virus del herpes contiene un gen que codifica una enzima con actividad catalítica no observada en células de mamíferos. Esta enzima es un tipo de timidincinasa (llamada HSV-TK) que añade un grupo fosfato a la base timina de un nucleótido de timidina. La HSV-TK también puede emplear ciertos análogos de timidina (compuestos de estructura química similar) como sustratos para fosforilación, incluyendo un compuesto denominado ganciclovir (o aciclovir), que comúnmente se prescribe contra las erupciones por virus del herpes. El ganciclovir, una vez fosforilado, entra a la vía de síntesis de DNA, pero no puede incorporarse al mismo. En vez de ello, este compuesto impide la síntesis de DNA provocando la muerte de la célula infectada. Por lo tanto, en presencia de ganciclovir, el HSV-TK actúa como "gen suicida" que causa la autodestrucción de la célula.

El gen HSV-TK se ha empleado con éxito en animales para destruir ciertos tumores cerebrales y en la actualidad está sometido a ensayos clínicos limi-

tados en el ser humano. En estos ensayos, retrovirus desactivados, portadores del gen HSV-TK introducido mediante manipulaciones de ingeniería genética, se inyectan en la masa del tumor cerebral donde son captados por una parte de las células. Las neuronas constituyen una población de células que no se dividen, por lo que no son susceptibles de infección por retrovirus y el procedimiento no las afecta (los tumores cerebrales constan de células gliales malignas). Una vez que las células tumorales captan al "gen suicida", se puede inyectar ganciclovir y provocar la destrucción de las células modificadas genéticamente. En estos ensayos con animales se observó que sólo una fracción de las células tumorales capta el retrovirus portador de HSV-TK, pero el resto de las células tumorales también pueden ser destruidas por los metabolitos tóxicos producidos por las células infectadas (el llamado "efecto del espectador"). Todavía no se sabe si éste o cualquier otro protocolo de geneterapia será útil contra el cáncer.

ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

La insuficiencia cardíaca congestiva aparece conforme el corazón pierde gradualmente su capacidad de contraerse con la fuerza requerida para circular la sangre de manera eficaz. La fuerza de contracción cardíaca normalmente aumenta por la hormona y el neurotransmisor epinefrina, el cual se enlaza a receptores β -adrenérgicos situados en la superficie de las células del músculo cardíaco. Una de las causas aparentes de insuficiencia cardíaca congestiva es la incapacidad de las células para responder a la epinefrina. Experimentos con animales indican que la fuerza contráctil del corazón puede aumentar mucho si las células del músculo cardíaco del animal contienen copias extra del gen que codifica el receptor β -adrenérgico, lo que aumenta el número de receptores de epinefrina sobre la superficie de la célula. El tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva en el hombre por

transfección de células cardíacas con genes que codifican receptores de adrenalina todavía es un objetivo distante, pero se ha demostrado la posibilidad de este método.

La principal causa de ataques al corazón es la oclusión de una o más arterias coronarias por la formación de placas (pág. 315). Uno de los procedimientos más comunes para corregir esta situación es la *angioplastia con balón*, en la cual se introduce un catéter en la arteria coronaria bloqueada. Posteriormente se infla la punta del catéter igual que un balón (fig. PH 10-1), distendiendo las paredes de la arteria hacia afuera. Infortunadamente, las arterias abiertas con este procedimiento casi siempre vuelven a cerrarse por el crecimiento de células musculares lisas en la pared del vaso. Experimentos con animales indican que se puede impedir la proliferación de estas células y mantener la arteria abierta mediante geneterapia. En un grupo de experimentos, las células de la arteria se infectaron con un adenovirus portador del gen HSV-TK en el sitio de la



FIGURA PH 10-1. Angioplastia con balón efectuada con el instrumento que aquí se muestra. Luego de introducir la sonda en la arteria coronaria bloqueada, se infla cerca de su extremo empujando las paredes de la arteria hacia afuera. (Según Dan McCoy/Rainbow.)

angioplastia con balón, seguido por exposición a ganciclovir para matar dichas células (como se describió antes). En otro grupo de experimentos se impidió la proliferación de células musculares lisas obligándolas a captar un gen que produce un RNA antisentido (pág. 439) que impide la traducción de un RNAm celular requerido para la proliferación de las células. Procedimientos de este tipo tal vez sean sistemáticos en la práctica médica del próximo siglo.

CONSIDERACIONES ETICAS

Es importante hacer notar que todos los procedimientos analizados, y también los considerados para aprobación, implican la modificación de *células somáticas*, células que no entran en la vía para formación de gametos. La modificación de células somáticas sólo afecta a la persona tratada y el cromosoma modificado no puede transmitirse a las futuras generaciones. Este no es el caso si se modifica cualquiera de

las células germinales de las gónadas o células del embrión temprano, puesto que esas células contribuyen a la formación de gametos. Hasta ahora hay consenso de no efectuar estudios que impliquen la modificación de células humanas de estirpe germinal. Esos estudios representan riesgos en lo referente a la constitución genética de generaciones futuras y plantean graves problemas éticos respecto de la intromisión de los científicos en la evolución humana.

LA VIA EXPERIMENTAL

Naturaleza química del gen

Tres años después de que Gregor Mendel presentara los resultados de su trabajo acerca de la herencia en plantas de guisantes, Friedrich Miescher se graduó en una escuela de medicina de Suiza y viajó a Tübingen, Alemania, a permanecer un año estudiando bajo la dirección de Ernst Hoppe-Seyler, uno de los químicos más notables (y tal vez el primer bioquímico) de ese periodo. Miescher se interesó en las sustancias químicas contenidas en el núcleo de la célula. Para aislar material de los núcleos celulares con un mínimo de contaminación por los componentes citoplásmicos, Miescher necesitaba células con núcleos grandes y fáciles de obtener en gran cantidad. Eligió leucocitos, que obtuvo del pus de vendajes quirúrgicos desechados por una clínica local. Miescher trató las células con ácido clorhídrico diluido al cual añadió un extracto desproteinado de estómago de cerdo (este extracto contenía pepsina, una enzima proteolítica). El residuo obtenido después de este tratamiento se componía principalmente de núcleos celulares aislados que se asentaron en el fondo del vaso. A continuación Miescher extrajo los núcleos con álcali diluido. El material soluble en álcali fue purificado adicionalmente mediante precipitación con ácido diluido y nueva extracción con álcali diluido. Miescher observó que el extracto alcalino contenía una sustancia con propiedades diferentes a las descubiertas previamente: era una molécula muy grande, de carácter ácido y rica en fósforo. Llamó "nucleína" a este material. El año de residencia de Miescher concluyó y retornó a su hogar en Suiza, en tanto Hoppe-Seyler, cauteloso acerca de los resultados, repitió el trabajo. Confirmados los resultados fueron publicados en 1871.¹

De vuelta en Suiza, Miescher continuó sus estudios de la química del núcleo celular. Como vivía cerca del río Rin po-

día obtener con facilidad salmones que nadaban contra la corriente y arribaban llenos de huevos o espermatozoides maduros. Los espermatozoides son células ideales para estudiar los núcleos. Igual que los leucocitos, se pueden obtener en gran cantidad y 90% de su volumen corresponde al núcleo. Las preparaciones de Miescher con nucleína obtenida de espermatozoides contenían un porcentaje más elevado de fósforo (casi 10% del peso), en comparación con leucocitos, lo que indica que contenían menos proteína contaminante. En realidad, fueron las primeras preparaciones de DNA relativamente puro. El término "ácido nucleico" fue acuñado en 1889 por Richard Altmann, alumno de Miescher, quien trabajó métodos de purificación de DNA libre de proteínas de varios tejidos animales y de levaduras.²

En los últimos dos decenios del siglo XIX, numerosos biólogos se dedicaron al estudio de los cromosomas, describieron su conducta durante la división celular y en el lapso entre las divisiones (pág. 390). Una manera de observar los cromosomas es teñirlos con colorantes. Un botánico llamado E. Zacharias descubrió que el mismo colorante que revela los cromosomas también colorea una preparación de nucleína extraída utilizando el procedimiento de Miescher de digestión con pepsina en un medio de HCl. Además, cuando las células extraídas con pepsina y HCl fueron extraídas subsecuentemente con álcali diluido, procedimiento ya conocido para extraer nucleína, el residuo celular (incluyendo los cromosomas) ya no contenía material coloreable. Estos y otros resultados apoyaron fuertemente la idea de que la nucleína era un componente de los cromosomas. En una proposición notablemente profética en 1884, Otto Hertwig, quien estudió la conducta de

los cromosomas durante la fertilización, afirmó: "Pienso que cuando menos hemos aumentado la probabilidad de que la nucleína sea la sustancia encargada no sólo de la fertilización, sino también de la transmisión de las características hereditarias."³ Irónicamente, conforme más se aprendía acerca de las propiedades de la nucleína, menos se le consideraba candidato para ser el material genético.

Durante los 50 años subsiguientes al descubrimiento del DNA por Miescher se describió la química de la molécula y la naturaleza de sus componentes. Algunas de las contribuciones más importantes en esta tarea fueron realizadas por Phoebus Aaron Levene, quien emigró de Rusia a Estados Unidos en 1891 y con el tiempo logró un puesto en el Rockefeller Institute de Nueva York. Levene fue quien finalmente resolvió uno de los problemas más persistentes de la química del DNA cuando en 1929 determinó que el azúcar de los nucleótidos era la 2-desoxirribosa.⁴ Para aislar el azúcar, Levene y E.S. London colocaron el DNA en el estómago de un perro mediante una abertura quirúrgica y luego recolectaron muestras del intestino del animal. Conforme el DNA pasó por el estómago y el intestino, varias enzimas del conducto digestivo del animal actuaron sobre la molécula fragmentando los nucleótidos en sus partes componentes que entonces se pudieron aislar y analizar. Levene resumió sus conocimientos de los ácidos nucleicos en una monografía publicada en 1931.⁵

Aunque la determinación de la estructura del DNA se acredita a Levene, también se le acredita el mayor tropiezo en la búsqueda de material genético. En este periodo, cada vez fue más evidente que las proteínas eran muy complejas y mostraban gran especificidad como catalizadores en una notable variedad de reacciones químicas. Por otro lado, se pensó que el DNA estaba compuesto por bloques formados por sus cuatro nucleótidos repetidos en forma monótona. El principal defensor de esta manera de visualizar el DNA, que se llamó teoría de los tetranucleótidos, fue Phoebus Levene. Puesto que los cromosomas sólo contienen dos elementos, o sea DNA y proteína, pocos dudaban que la proteína fuera el material genético.

Mientras tanto, conforme se fue trabajando la estructura del DNA, se desarrolló una línea de investigación aparentemente independiente en el campo de la bacteriología. A principios del decenio de 1920 se observó que algunas especies de bacterias patógenas podían crecer en el laboratorio en dos formas diferentes. Las bacterias virulentas, o sea, células bacterianas capaces de provocar enfermedad, formaron colonias lisas, regulares, en forma de domo; por lo contrario, las células bacterianas no virulentas crecieron en colonias que eran rugosas, planas e irregulares (fig. VE 10-1).⁶ El microbiólogo británico J.A. Arkwright introdujo los términos liso (L) y rugoso (R) para describir estos dos tipos. Observadas al microscopio, las células que formaban las colonias L estaban rodeadas por una cápsula gelatinosa, de la cual carecían las células de las colonias R. La cápsula bacteriana protege a la bacteria de las defensas del huésped, lo que explica por qué las células R, sin cápsula, no provocan infección en animales de laboratorio.

Debido a su impacto tan grande sobre la salud humana, las bacterias causantes de neumonía (*Streptococcus pneumoniae* o simplemente neumococo) son desde hace mucho tiempo foco

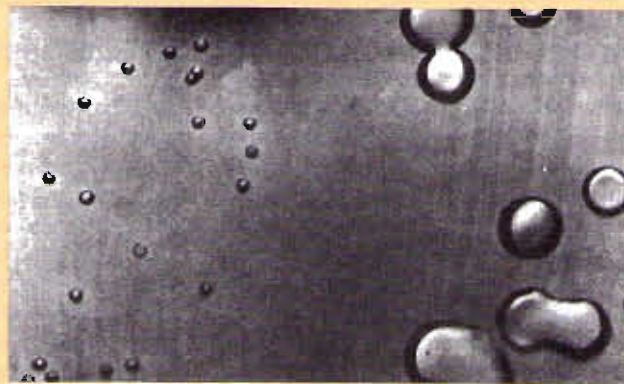


FIGURA VE 10-1. Las colonias brillantes grandes a la derecha son de neumococos virulentos tipo S resultantes de la transformación de un neumococo no virulento tipo R (colonias más pequeñas) por DNA procedente de neumococos S muertos por calor. (Según O.T. Avery, C.M. MacLeod y M. McCarty, J. Exp. Med. 79:153, 1944; con permiso de Rockefeller University Press.)

de atención entre los microbiólogos. En 1923, Frederick Griffith, médico en el Ministerio Británico de Salud, demostró que los neumococos también crecen como colonias L o R, y además que las dos formas eran interconvertibles; o sea, en ocasiones una bacteria R podía convertirse en una bacteria L, o viceversa.⁷ Griffith observó, por ejemplo, que si inyectaba un número excepcionalmente grande de bacterias R a un ratón, el animal a menudo desarrollaba neumonía y producía bacterias que formaban colonias de la forma L.

Anteriormente se había demostrado que el neumococo se presenta en varios tipos distintos (tipos I, II y III) inmunológicamente distinguibles entre sí. En otras palabras, se pueden obtener anticuerpos de animales infectados que sólo reaccionan con uno de los tres tipos. Más aún, una bacteria de un tipo nunca da lugar a células de otro tipo. Cada uno de los tres tipos de neumococos podía ocurrir en la forma L o R.

En 1928, Griffith hizo un descubrimiento sorprendente cuando inyectó varias preparaciones bacterianas a un ratón.⁸ La inyección de numerosas bacterias L muertas por calor o de un pequeño número de bacterias R vivas, por sí mismas no causaron daño al ratón; sin embargo, cuando se inyectaron juntas ambas preparaciones al mismo ratón, este contrajo neumonía y murió. Se pudieron aislar y cultivar bacterias virulentas del ratón. Para ampliar sus datos, inyectó combinaciones de bacterias de diferentes tipos (fig. VE 10-2). Inicialmente inyectó ocho ratones con bacterias L de tipo I muertas por calor junto con un pequeño inóculo de la cepa R tipo II de bacterias vivas. Dos de los ocho animales contrajeron neumonía y Griffith pudo aislar y cultivar células bacterianas L tipo I virulentas del ratón infectado. Era imposible que las bacterias muertas por calor hubieran vuelto a la vida, por lo que Griffith concluyó que las células muertas tipo I habían suministrado algo a las células vivas no encapsuladas tipo II que las transformó en la forma encapsulada tipo I. Cuando creció en cultivo, la bacteria transformada continuó produciendo células tipo I y por lo tanto el cambio era estable y permanente. Griffith trató

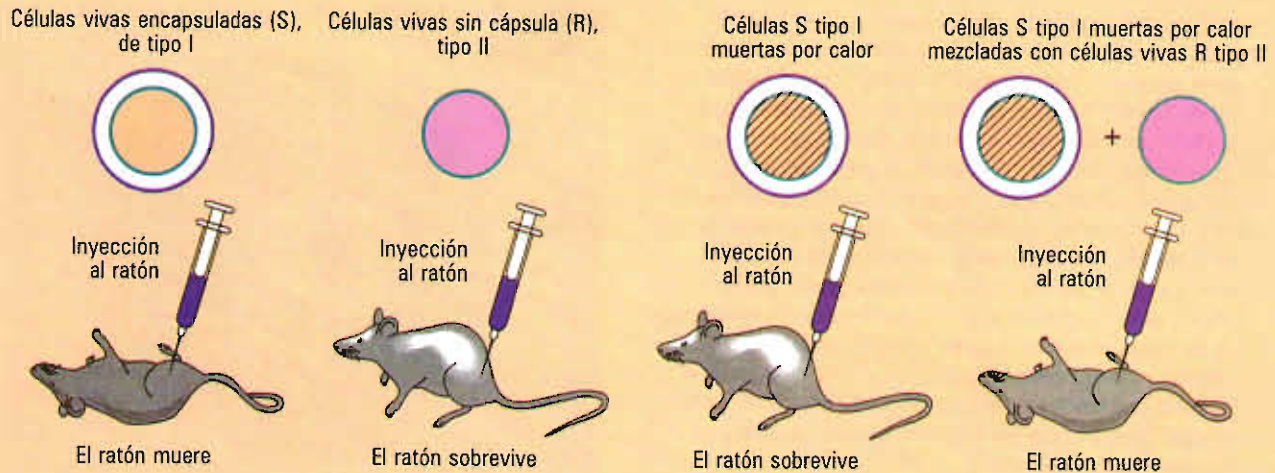


FIGURA VE 10-2. Diseño del experimento efectuado por Griffith para el descubrimiento de la transformación bacteriana.

de demostrar que las cepas R tipo I podían transformarse permanentemente en los tipos L II y III, y viceversa. En todos los casos, la transformación pareció ser de tipo específico, predecible y hereditaria.

Los datos de Griffith acerca de esta transformación rápidamente fueron confirmados por varios laboratorios en todo el mundo, incluyendo el de Oswald Avery, inmunólogo en el Rockefeller Institute, la misma institución donde trabajaba Levene. Al principio, Avery dudó que una sustancia liberada por una célula muerta pudiera alterar el aspecto de una célula viva, pero se convenció cuando Martin Dawson, su joven ayudante, confirmó los mismos resultados en su laboratorio.⁹ Entonces Dawson intentó demostrar que la transformación no necesariamente ocurre en un animal huésped vivo. Un extracto crudo de bacterias L muertas, mezclado con un pequeño número de células no virulentas (R) cultivadas en presencia del antisuero R, podía convertir las células R en la forma L virulenta. Las células transformadas siempre fueron del tipo I, II o III característico de las células L muertas.¹⁰

El siguiente paso lo dio J. Lionel Alloway, otro miembro del laboratorio de Avery, quien pudo solubilizar el agente transformador. Esto se logró congelando y descongelando rápidamente células muertas donadoras, calentando en seguida las células fragmentadas, centrifugando la suspensión y haciendo pasar el sobrenadante a través de un filtro de porcelana cuyos poros impedían el paso de bacterias. El extracto soluble así filtrado mostró la misma capacidad transformadora que las células originalmente muertas por calor.¹¹

En los siguientes diez años, Avery y sus colegas enfocaron su atención en purificar la sustancia causante de la transformación y en determinar su identidad. Tan sorprendente como puede parecer ahora, en aquel tiempo ningún otro laboratorio del mundo se dedicó a identificar el "principio transformador", como lo llamó Avery. Los avances en este problema fueron lentos.^{detallado en 12} Con el tiempo, Avery y sus colaboradores, Colin MacLeod y Maclyn McCarty, lograron aislar

una sustancia activa del extracto soluble capaz de causar la transformación en concentración de apenas una parte en 600 millones. Todas las pruebas sugerían que la sustancia activa era DNA: 1) mostraba muchas de las propiedades químicas características del DNA; 2) ningún otro tipo de material pudo detectarse en la preparación, y 3) los ensayos con diferentes enzimas mostraron que sólo aquellas capaces de digerir DNA podían inactivar el principio transformador.

El trabajo publicado en 1944 fue escrito con escrupulosa cautela, sin conclusiones espectaculares afirmando que los genes estaban constituidos por DNA y no por proteínas.¹³ Es digno de mencionar que el trabajo despertó muy poca atención. Maclyn McCarty, uno de los tres autores, narra un incidente ocurrido en 1949 cuando se le invitó a hablar en la Johns Hopkins University, junto con Leslie Gay, quien estaba probando los efectos del nuevo fármaco Dramamine para tratar el mareo de traslación. La gran sala estaba repleta de personas, y "luego de un breve periodo de preguntas y respuestas después después de la presentación del trabajo [de Gay], el presidente de la Sociedad me presentó como segundo orador. Muy poco de lo que dijo se pudo escuchar a causa del bullicio de la gente que permanecía fuera de la sala. Cuando concluyó la salida de quienes abandonaron la sala, después de los primeros minutos de mi discurso pude contar escasas 35 personas que permanecieron en el auditorio, quizá por escuchar algo acerca de la transformación del neumococo o porque sintieron que debían quedarse por cortesía". Pero el verdadero potencial del descubrimiento de Avery se revela en una carta que escribió en 1943 a su hermano Roy, también bacteriólogo:

Si estamos en lo correcto, y por supuesto que esto todavía no se ha demostrado, entonces significa que los ácidos nucleicos no sólo son importantes desde el punto de vista estructural, sino también las sustancias funcionalmente activas para definir la actividad bioquímica y las características específicas de una célula, y que por

medio de una sustancia química conocida es posible inducir cambios predecibles hereditarios en las células. Esto es algo que durante mucho tiempo fue el sueño de los genetistas... Suena como si un virus pudiera ser un gen. Pero con los mecanismos que ahora me interesan, un paso cada vez... Por supuesto, el problema está erizado de implicaciones... Se relaciona con genética, química enzimática, metabolismo celular y síntesis de carbohidratos, etc. Pero en la actualidad se requieren suficientes pruebas bien comprobadas para convencer a todos de que la sal sódica del ácido desoxirribonucleico, libre de proteínas, está dotada con esta actividad biológica y propiedades específicas y esta es la prueba que ahora tratamos de obtener. Es muy divertido inflar burbujas, pero es más sensato reventarlas uno mismo antes que alguien lo haga.

Se han dedicado muchos artículos y pasajes de libros a averiguar la razón de la falta de entusiasmo hacia los datos de Avery. Parte de ello quizá sea el estilo humilde del artículo y el hecho de que Avery era bacteriólogo, no genetista. Algunos biólogos estaban convencidos de que las preparaciones de Avery debían estar contaminadas con cantidades mínimas de proteína y que ese contaminante, no el DNA, era el agente transformador activo. Otros se preguntaban si estudios acerca de bacterias publicados en una revista médica podían tener relevancia alguna en el campo de la genética y consideraban el fenómeno de la transformación como una peculiaridad de las bacterias.

En los años siguientes a la publicación del trabajo de Avery hubo cambios importantes en la genética, se reconoció la existencia de cromosomas bacterianos y algunos prominentes genetistas volvieron su atención a esos procariotes. Estos científicos estaban convencidos de que el conocimiento logrado por el estudio de organismos celulares muy simples arrojaría luz sobre los mecanismos que operan en plantas y animales más complejos. Además, los trabajos de Erwin Chargaff y sus colegas acerca de la composición de las bases del DNA¹⁴ acabó con la idea de que esta molécula sólo era una simple serie de nucleótidos repetidos (estudiada en la página 396). Este dato reveló a los investigadores la posibilidad de que el DNA posea las propiedades necesarias para desempeñar un papel en el almacenamiento de información.

Siete años después de la publicación del trabajo de Avery acerca de la transformación bacteriana, Alfred Hershey y Martha Chase, de Cold Spring Harbor Laboratories en Nueva York, prestaron su atención a un sistema todavía más simple: los bacteriófagos, o virus que infectan células bacterianas. Alrededor de 1950, los investigadores reconocieron que aun los virus tenían un programa genético. El material genético inyectado a una célula huésped pudo dirigir la formación de nuevas partículas virales dentro de la célula infectada. En cuestión de minutos, la célula infectada estalló y liberó nuevas partículas del bacteriófago que infectaron células huésped vecinas.

Era claro que el material genético capaz de dirigir la formación de la progenie viral debía ser DNA o proteína, puesto que eran las únicas dos moléculas en el virus. Observaciones con microscopio electrónico demostraron que durante la infec-

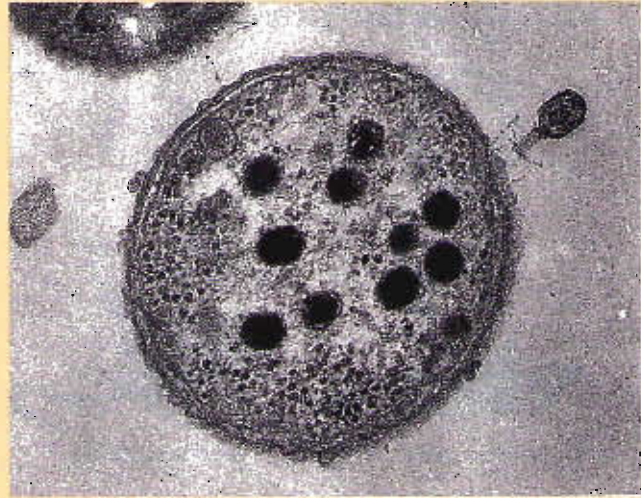
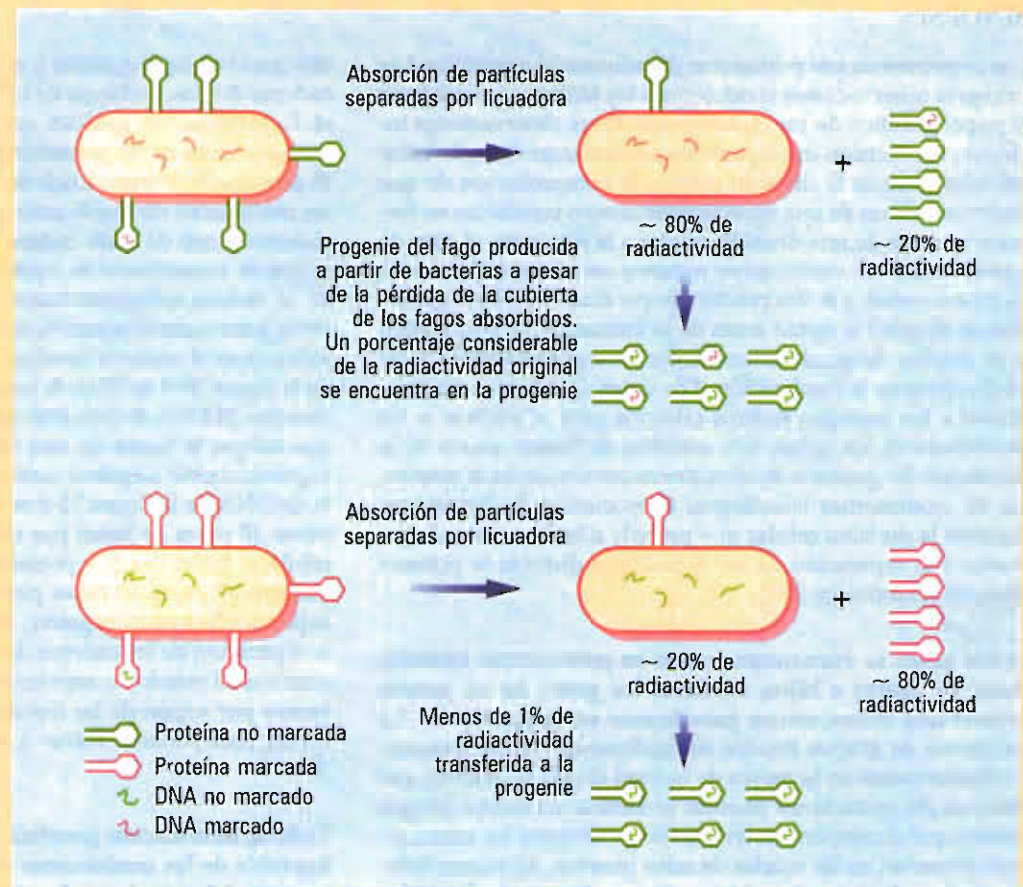


FIGURA VE 10-3. Micrografía electrónica de una célula bacteriana infectada por el bacteriófago T4. Se observa un fago unido a la superficie externa de la célula bacteriana mediante las fibras de su apéndice, en tanto se ensamblan nuevas cabezas de fago en el citoplasma de la célula huésped. (Cortesía de Jonathan King y Erika Hartwig.)

ción, la masa del bacteriófago permanece fuera de la célula, fija a la superficie celular por apéndices fibrosos (fig. VE 10-3). Hershey y Chase razonaron que el material genético del virus debía poseer dos propiedades. Primero, si el material dirige el desarrollo de nuevos bacteriófagos durante la infección entonces debe pasar al interior de la célula infectada. Segundo, debe transmitirse a la siguiente generación de bacteriófagos. Hershey y Chase prepararon dos grupos de bacteriófagos para utilizar como material infectante (fig. VE 10-4). Un grupo contenía DNA marcado con fósforo radiactivo (DNA-³²P); el otro grupo contenía proteína marcada con azufre radiactivo (proteína-³⁵S). Puesto que el DNA carece de átomos de azufre (S) y la proteína de ordinario carece de átomos de fósforo (P), estos dos radioisótopos suministraron marcas distinguibles en los dos tipos de macromoléculas. El plan experimental consistió en infectar una población de células bacterianas con uno u otro tipo de bacteriófago, esperar unos pocos minutos y luego desprender los virus vacíos de la superficie celular. Luego de intentar varios métodos para separar la cubierta del fago unida a la bacteria, observaron que la mejor manera de lograrlo era someter la suspensión de bacterias infectadas a la acción de las hojas giratorias de una licuadora Waring. Una vez desprendidas las partículas del virus de las células se pudieron centrifugar las bacterias al fondo del tubo, permaneciendo los virus vacíos en suspensión.

Siguiendo este procedimiento Hershey y Chase determinaron la radiactividad dentro de las células en comparación con la radiactividad en las cubiertas vacías del fago. Observaron que en células infectadas con bacteriófago marcado con proteína radiactiva, la radiactividad permanecía en las cubiertas vacías. Por lo contrario, en células infectadas con bacteriófago marcado con DNA radiactivo, la radiactividad pasa al interior de la célula huésped. Respecto de la radiactividad trans-

FIGURA VE 10-4. Diseño del experimento de Hershey-Chase mostrando que las células bacterianas infectadas por un fago que contiene DNA marcado con ^{32}P se volvió radiactivo y produjo progenie de fagos marcados, en tanto que las células bacterianas infectadas con fagos que contenían proteína marcada con ^{35}S no presentaron radiactividad y produjeron progenie no marcada.



mitida a la siguiente generación, encontraron menos de 1% de la proteína marcada en la progenie, y casi 30% del DNA marcado pasó a la siguiente generación.

La publicación de los experimentos de Hershey y Chase, en 1952,¹⁵ junto con el abandono de la teoría de los tetranucleótidos, suprimió todos los obstáculos restantes para aceptar que el DNA era el material genético. De momento se generó un nuevo y enorme interés hacia una molécula hasta entonces ignorada. El escenario estaba listo para el descubrimiento de la doble hélice.

BIBLIOGRAFIA

1. Miescher, J.F. 1871. *Hoppe-Seyler's Med. Chem. Untersuchungen*. 4:441.
2. Altmann, R. 1889. *Anat. u. Physiol., Physiol. Abt.* 524.
3. Tomado de Mirsky, A.E. 1968. The Discovery of DNA. *Sci. Amer.* 218:78-88.
4. Levene, P.A. y London, E.S. 1929. The structure of thymonucleic acid. *J. Biol. Chem.* 83:803-816.
5. Levene, P.A. y Bass, L.W. 1931. *Nucleic Acids*. The Chemical Catalog Co.
6. Arkwright, J.A. 1921. Variation in bacteria in relation to agglutination both by salts and by specific serum. *J. Path. Bact.* 24:36-60.
7. Griffith, F. 1923. The influence of immune serum on the biological properties of pneumococci. *Reports on Public Health and Medical Subjects* 18:1-13.
8. Griffith, F. 1928. The significance of pneumococcal types. *J. Hygiene* 27:113-159.
9. Dawson, M.H. 1930. The transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* 51:123-147.
10. Dawson, M.H. y Sia, R.H.P. 1931. In vitro transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* 55:701-710.
11. Alloway, J.L. 1932. The transformation in vitro of R pneumococci into S forms of different specific types by use of filtered pneumococcus extracts. *J. Exp. Med.* 55:91-99.
12. McCarty, M. 1985. *The Transforming Principle: Discovering that Genes Are Made of DNA*. Norton.
13. Avery, O.T., MacLeod, C.M. y McCarty, M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* 79:137-158.
14. Chargaff, E. 1950. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymic degradation. *Experientia* 6:201-209.
15. Hershey, A.D. y Chase, M. 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 36:39-56.

SINOPSIS

Los cromosomas son portadores de información genética. Las primeras observaciones condujeron a los biólogos a considerar el papel genético de los cromosomas. Estas observaciones incluyen: la precisión del reparto de cromosomas entre las células hijas durante la división celular; la comprobación de que los cromosomas de una especie permanecen constantes en forma y número de una división celular a la siguiente; el dato de que el desarrollo embrionario requiere un conjunto particular de cromosomas, y la observación de que el número de cromosomas se divide a la mitad antes de la formación de los gametos y se duplica luego de la unión de un espermatozoide y un óvulo durante la fertilización. Los datos de Mendel suministraron a los biólogos nuevos criterios para identificar a los portadores de los genes. Los estudios de Sutton acerca de la formación de gametos en el saltamontes revelaron la existencia de cromosomas homólogos, la asociación de homólogos durante la división celular que precede a la formación de gametos y la separación de los homólogos durante la primera división meiótica (p. 390).

Si los genes se encuentran juntos en cromosomas transmitidos de padres a hijos, entonces los genes de un mismo cromosoma deben unirse para formar un grupo ligado. La existencia de grupos ligados se confirmó en varios sistemas, particularmente en la mosca de la fruta donde se observó que docenas de mutaciones pueden ordenarse en cuatro grupos unidos que corresponden en tamaño y número a los cromosomas presentes en las células de estos insectos. Al mismo tiempo, se descubrió que la unión era incompleta; o sea, los alelos originalmente presentes en determinado cromosoma no permanecen necesariamente juntos durante la formación de los gametos, sino que pueden ser "barajados" entre los homólogos paternos y maternos. Este fenómeno, al cual Morgan denominó entrecruzamiento, se debía al rompimiento y reunión de segmentos de cromosomas homólogos que ocurría cuando los homólogos se asociaban físicamente durante la primera división meiótica. El análisis de descendientes por apareamiento entre adultos portadores de un tipo de mutación sobre el mismo cromosoma indica que la frecuencia de recombinación entre dos genes suministra una medida de la distancia relativa que separa esos dos genes. Por lo tanto, se puede emplear la frecuencia de recombinaciones para preparar mapas detallados de series ordenadas de genes a lo largo de cada cromosoma de una especie. El mapa genético de la mosca de la fruta, basado en la frecuencia de recombinaciones, se comprobó de manera independiente mediante el examen de la localización de diferentes bandas en el cromosoma politeno gigante observado en ciertos tejidos larvarios de estos insectos (p. 392).

Los experimentos analizados en *La vía experimental* suministran datos concluyentes de que el material genético es DNA. El DNA es una molécula helicoidal con dos cadenas de nucleótidos que corren en direcciones opuestas con un esqueleto central exterior y las bases nitrogenadas mirando hacia adentro. Los nucleótidos de una cadena que contienen adenina siempre forman pareja con los nucleótidos de la otra cadena que contienen timina, lo mismo ocurre con los nucleóti-

dos que contienen guanina y citosina. Como resultado, las dos cadenas de una molécula de DNA son complementarias entre sí. La información genética está codificada en la secuencia lineal específica de los nucleótidos que constituyen las cadenas. El modelo de Watson-Crick de la estructura del DNA sugirió un mecanismo de duplicación, incluyendo separación de las cadenas y uso de cada cadena como plantilla para dirigir el orden de ensamblado de nucleótidos durante la construcción de la cadena complementaria. El mecanismo por el cual el DNA gobernaba el ensamblado de una proteína específica permanecía en el misterio absoluto. El modelo de DNA mostrado en la figura 10-9 es DNA-B, una forma helicoidal con giro a la derecha. El DNA-B contrasta más notablemente con el DNA-Z que adopta la forma de una hélice con giro a la izquierda y cuyo eje central adquiere conformación en zigzag. La molécula de DNA de la figura 10-9 se encuentra en estado relajado y posee 10 pares de bases por vuelta de la hélice. Dentro de la célula, el DNA tiende a presentarse subenrollado (con menor número de pares de bases por vuelta) y se dice que muestra superenrollamiento negativo, condición que tiende a facilitar la separación de las cadenas durante la duplicación y la transcripción. El estado de superenrollamiento del DNA puede alterarse por acción de las topoisomerasas, enzimas capaces de cortar, redistribuir y volver a sellar las cadenas de DNA (p. 395).

Toda la información genética presente en un solo conjunto haploide de los cromosomas de un organismo constituye el genoma del organismo. La variedad de secuencias del DNA que forman el genoma y el número de copias de esas diferentes secuencias describen la complejidad del genoma. El conocimiento de la complejidad del genoma procede de los primeros estudios que mostraron una molécula de DNA constituida por dos cadenas separables por calor; cuando la temperatura de la solución desciende, las cadenas complementarias simples vuelven a asociarse para formar la doble cadena de las moléculas estables de DNA. El análisis de la cinética de este proceso de reasociación suministra una medida de la concentración de secuencias complementarias, que a su vez indica la variedad de secuencias presentes en una cantidad determinada de DNA. Cuanto mayor sea el número de copias de una secuencia particular en el genoma, mayor será su concentración y más rápida su reconstrucción (p. 401).

Cuando se reconstruyen fragmentos de DNA procedentes de células eucariotas, de ordinario la curva muestra tres pasos distintos que corresponden a la renaturalización de tres diferentes tipos de secuencias de DNA. La fracción altamente repetida consta de secuencias de DNA cortas repetidas en gran número; incluye DNA satélite situado en el centrómero de los cromosomas, DNA minisatélite y DNA microsatélite. Este último grupo tiende a ser muy variable, causa ciertas enfermedades hereditarias y constituye la base de técnicas dactiloscópicas con DNA. La fracción moderadamente repetida incluye secuencias de DNA que codifican RNA ribosómico y de transferencia y proteínas histona, así como varias secuencias con funciones no codificantes. La fracción no repetida contiene

genes codificadores de proteínas, de los cuales sólo hay una copia por conjunto haploide de cromosomas (p. 419).

La organización de las secuencias del genoma puede cambiar lentamente en el curso de la evolución o rápidamente como consecuencia de una transposición. Los genes eucariotas que codifican proteínas casi siempre son miembros de la familia de multigenes cuyos elementos presentan datos de haber evolucionado a partir de un gen ancestral común. Se cree que el primer paso en este proceso es la duplicación de un gen, la mayor parte de las veces quizá por entrecruzamiento desigual. Una vez ocurrida la duplicación, sería de esperar que la sustitución de nucleótidos modifique a varios miembros en diferentes formas y produzca una familia de secuencias repetidas con estructura similar pero no idéntica. Los genes de globina, por ejemplo, constan de grupos de genes localizados en dos cromosomas distintos. Cada grupo contiene varios genes relacionados que codifican polipéptidos de globina empleados en diversas etapas de la vida del animal. Los grupos también contienen pseudogenes, homólogos de los genes de globina, pero no funcionales. Se puede seguir la duplicación de genes en el laboratorio durante generaciones exponiendo células cultivadas a fármacos capaces de seleccionar células con mayor número de copias de una proteína particular (p. 404).

Ciertas secuencias de DNA pueden mudarse rápidamente por transposición de un sitio a otro en el genoma. Estos elementos capaces de mudarse se denominan transposones y pueden integrarse al azar a través de todo el genoma. Los transposones mejor estudiados son los de bacterias. Se caracterizan por repeticiones inversas en su extremo terminal y segmentos internos que codifican una transposasa requerida para su integración y la formación de secuencias cortas repetidas en

los DNA huésped que flanquean el elemento en el sitio de integración. Los transposones bacterianos con frecuencia contienen genes resistentes a antibióticos que han contribuido a propagar cepas de bacterias resistentes. Los elementos eucariotas susceptibles de cambiar de sitio pueden desplazarse mediante varios mecanismos. Algunos se duplican y la copia se introduce en un sitio específico dejando sin cambios el sitio donador. En otros casos, el elemento es escindido del sitio donador e introducido en un sitio específico. En la mayor parte de los casos, el elemento se transcribe a un RNA que puede ser copiado por una transcriptasa inversa codificada por el elemento, y el DNA copiado se integra en el sitio específico. La fracción moderadamente repetida del DNA humano contiene dos grandes familias de elementos mudables, la familia *Alu* y la L1 (p. 413).

Una muestra dada de DNA puede romperse en un conjunto definido de fragmentos mediante tratamiento con endonucleasas de restricción procedentes de bacterias que reconocen una secuencia específica de cuatro a ocho nucleótidos y pueden cortar ambas cadenas del doble DNA. Diferentes enzimas desdoblan la misma preparación de DNA en diferentes conjuntos de fragmentos de restricción. Los sitios del genoma separados por diversas enzimas pueden identificarse y ordenarse en un mapa de restricción. Cuando el DNA de diferentes personas (incluso gemelos no idénticos) se trata con una enzima de restricción, la longitud de los fragmentos es similar, pero no idéntica, debido a diferencias en las secuencias de nucleótidos de una persona a otra. Estas diferencias se conocen como polimorfismo por restricción de la longitud de fragmentos (PRLF). Los PRLF pueden usarse para identificar individuos mediante técnicas dactiloscópicas con DNA o trazar la herencia de un gen particular (p. 418).

PREGUNTAS DE REPASO

1. ¿Qué es un grupo unido? ¿Cuál es su relación con un cromosoma? ¿Cómo se puede determinar el número de grupos unidos en una especie?
2. ¿Qué es un marcador genético? ¿Cómo actúan las mutaciones como marcadores genéticos? ¿Cuál es el significado de un marcador genético altamente polimórfico? Mencione un ejemplo de marcador altamente polimórfico y cuál es la ventaja de emplearlo en el mapeo genético.
3. ¿Qué se entiende por unión incompleta? ¿Cuál es su relación con la formación de parejas de cromosomas homólogos durante la meiosis?
4. ¿En qué difieren los cromosomas politeno de un insecto de los cromosomas normales?
5. ¿Qué significa la polaridad de una cadena de DNA? ¿Que las dos cadenas sean antiparalelas? ¿Que la molécula tenga un surco mayor y un surco menor? ¿Que las cadenas sean complementarias entre sí?
6. ¿Cuál fue la importancia del análisis de Chargaff acerca de la composición de bases del DNA para determinar la estructura de la doble hélice?
7. ¿Qué es un genoma? ¿En qué difiere un genoma bacteriano complejo de un genoma eucariota?
8. ¿Qué significa el término desnaturalización del DNA? ¿Por qué la desnaturalización depende del contenido G-C del DNA? ¿Cómo puede afectar esta variable a la T_m ?
9. ¿Qué es un DNA microsatélite? ¿Cuál es el papel de estas secuencias en las enfermedades humanas? ¿Cómo se demostró su utilidad en genética humana?
10. ¿Qué tipo de presiones selectivas condujeron a la evolución de secuencias de DNA repetidas con funciones codificantes? ¿Qué tipos de producto codifican? ¿Cuál es la consecuencia para el genoma humano de las secuencias de DNA repetidas que carecen de funciones codificantes?
11. ¿Qué fracción del genoma contiene la mayor cantidad de información? ¿Por qué esto es cierto?
12. Describir el curso de los acontecimientos evolutivos que se cree dieron lugar a familias de multigenes como las que codifican las globinas. ¿Cómo pueden estos sucesos dar lugar a pseudogenes? ¿Cómo se originaron las proteínas con funciones totalmente diferentes?

13. Describir tres mecanismos para el desplazamiento de los elementos genéticos de un sitio a otro en el genoma.
14. Describir los pasos para preparar un mapa de restricción de una parte del DNA utilizando una enzima de restricción particular.
15. ¿Qué es un PRLF? ¿Cómo se utilizan los PRLF para identificar genes como el que codifica la fibrosis quística?

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. ¿En qué hubieran diferido los resultados de Mendel si dos de los siete rasgos estudiados fueran codificados por genes situados uno cerca del otro sobre alguno de los cromosomas de las plantas de guisante?
2. Sutton pudo suministrar datos visuales de la ley de segregación de Mendel. ¿Por qué le habría sido imposible confirmar o refutar la ley de la permutación independiente de Mendel?
3. Los genes X, Y y Z se localizan sobre un cromosoma. Dibujar un mapa sencillo mostrando el orden de los genes y la distancia relativa entre los genes X, Y y Z utilizando los datos que siguen:

Frecuencia de entrecruzamiento	Entre estos genes
36%	X-Z
10%	Y-Z
26%	X-Y

4. Alelos situados sobre extremos opuestos de un cromosoma tienen tal probabilidad de separarse durante el entrecruzamiento que pueden hacerlo de manera independiente. ¿Cómo se puede determinar mediante cruzamiento genético si estos dos genes pertenecen al mismo grupo unido? ¿Cómo se podría establecer esto utilizando la hibridación de ácido nucleico?
5. ¿En qué puntos de la curva de la figura 10-20 se observaría la renaturalización del DNA que codifica RNA ribosómico? Suponga que tiene una preparación pura de fragmentos de DNA cuyas secuencias codifican RNA ribosómico. Dibujar la renaturalización de este DNA superpuesta a la curva de DNA total mostrada en la figura 10-20.
6. ¿Estaría usted de acuerdo con la siguiente afirmación? En una población promedio de fragmentos de DNA eucariotas de longitud promedio de 200 nucleótidos, una enzima de restricción podría atacar la mayor parte de los fragmentos. En caso contrario, ¿por qué no?
7. Se le proporciona una muestra de DNA extraído de una fuente desconocida. Después de fragmentación y desnaturalización se encuentra una curva de renaturalización poco

- habitual con sólo 10% del DNA formado por secuencias de DNA no repetidas (copia única). 1) Dibujar la curva de renaturalización. 2) Asumiendo que se desea una preparación pura con secuencias únicas de DNA para emplear en experimentos subsecuentes, ¿cómo se puede obtener dicha preparación? 3) Dibujar la curva de renaturalización de esta preparación pura de DNA no repetido superpuesta a la curva de la parte 1.
8. Supongamos que se tienen dos soluciones de DNA, una de cadena simple y la otra de cadena doble, con absorbancia equivalente a 260 nm. ¿Cómo se podría comparar la concentración de DNA en estas dos soluciones?
 9. ¿Cuál patrón de marcado sería de esperar después de hibridación *in situ* entre cromosomas mitóticos y RNAm de mioglobina marcada? ¿Entre los mismos cromosomas y DNA de histona marcada?
 10. Según la composición de bases determinada por Chargaff, ¿cuál de las siguientes caracterizaría toda muestra de DNA? 1) $[A] + [T] = [G] + [C]$; 2) $[A]/[T] = 1$; 3) $[G] = [C]$; 4) $[A] + [G] = [T] + [C]$. Si el contenido de C de la preparación de una doble cadena de DNA es de 15%, ¿cuál es su contenido de A?
 11. Si 30% de las bases de una cadena única de DNA son T, entonces 30% de las bases de dicha cadena serán A. ¿Cierto o falso? ¿Por qué?
 12. ¿Concuerda usted con la afirmación de que T_m representa la temperatura en la cual 50% de las moléculas de DNA en una solución son de cadena única?
 13. Supongamos que encuentra un primate con un gen β -globina con una sola secuencia interpuesta. ¿Piensa que este animal pudo haber evolucionado de un ancestro primitivo que se separó de otros animales antes de la aparición del segundo intrón?
 14. ¿Por qué se considera un suceso al azar la amplificación del gen de DHFR cuando es el único gen del genoma que se amplifica en células que crecen en metotrexato?
 15. En el momento actual, una persona puede enterarse con 85% de certidumbre si padecerá enfermedad de Huntington mediante el análisis de PRLF. ¿Por qué piensa usted que no puede haber 100% de certidumbre?

BIBLIOGRAFÍA

Referencias generales

- Adams, R.L.P. y cols. 1986. *The Biochemistry of the Nucleic Acids*. Chapman & Hall.
- Judson, H.F. 1979. *The Eighth Day of Creation*. Simon & Schuster.
- Moore, J.A. 1972. *Heredity and Development*, 2a. ed. Oxford.
- Saenger, W. 1984. *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer-Verlag.

- Singer, M. y Berg, P. 1991. *Genes and Genomes*. University Science Books.
- Watson, J.D. y cols. 1987. *Molecular Biology of the Gene*. 4a. ed. Benjamin-Cummings.

Estructura y topología del DNA

- Cozzarelli, N.R. y Wang, J.C., eds. 1990. *DNA Topology and Its Biological Effects*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Drew, H.R. y McCall, M.J. 1988. Recent studies of DNA in the crystal. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4:1-20.
- Felsenfeld, G. 1985. DNA. *Sci. Am.* 253:88-99 (oct.).
- Hagerman, P.J. 1990. Sequence-directed curvature of DNA. *Ann. Rev. Biochem.* 59:755-781.
- Hall, S.S. 1993. Old school ties: Watson, Crick, and 40 years later. *Science* 259:1532-1533.
- Hsieh, T.-S. 1992. DNA topoisomerases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:396-400.
- McCarty, M. 1985. *The Transforming Principle*. Norton.
- Mirsky, A.E. 1978. The discovery of DNA. *Sci. Am.* 218:78-88 (junio).
- Olby, R. 1974. *The Path to the Double Helix*. University of Washington Press.
- Roca, J. 1995. The mechanisms of DNA topoisomerases. *Trends Biochem. Sci.* 20:187-190.
- Wang, J.C. 1991. DNA topoisomerases: Why so many? *J. Biol. Chem.* 266:6659-6662.
- Watson, J.D. y Crick, F.C. 1953. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737-738.
- Zimmerman, S.B. 1982. The three-dimensional structure of DNA. *Ann. Rev. Biochem.* 51:395-427.
- La complejidad del genoma**
- Britten, R.J. y Kohne, D.E. 1970. Repeated segments of DNA. *Sci. Am.* 222:24-31 (abril).
- Charlesworth, B. y cols. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215-220.
- Deininger, P.L. y Daniels G.R. 1986. The recent evolution of mammalian repetitive elements. *Trends Genetics* 2:76-80.
- Fields, C. y cols. 1994. How many genes in the human genome? *Nature Genetics* 7:345-346.
- Marmur, J. 1994. DNA strand separation, renaturation, and hybridization. *Trends Biochem. Sci.* 19:343-346.
- Morrell, V. 1993. The puzzle of triple repeats. *Science* 260:1422-1423.
- Pardue, M.L. y Gall, J.G. 1970. Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science* 168:1356-1358.
- Transposición**
- DiNocera, P.P. y Sakaki, Y. 1990. A superfamily of retrotransposable ubiquitous DNA elements. *Trends Genetics* 6:29-30.
- Federoff, N. 1992. Barbara McClintock: The geneticist, the genius, the woman. An obituary. *Cell* 71:181-182.
- Finnegan, D.J. 1989. Eukaryotic transposable elements and genome evolution. *Trends Genetics* 5:103-107.
- Kleckner, N. 1990. Regulation of transposition in bacteria. *Ann. Rev. Biochem.* 6:297-327.
- Mizuuchi, K. 1992. Transpositional recombination. *Ann. Rev. Biochem.* 61:1011-1051.
- Pardue, M.L. 1991. Dynamic instability of chromosomes and genomes. *Cell* 66:427-431.
- Plasterk, R.H.A. 1993. Molecular mechanisms of transposition and its control. *Cell* 74:781-786.
- Geneterapia**
- Anderson, W.F. 1994. Human gene therapy. *Human Gene Therapy* 5:1-2.
- Barinaga, M. 1994. Gene therapy for clogged arteries passes tests in pigs. *Science* 265:738.
- Marx, J. 1993. A first step toward gene therapy for hemophilia B? *Science* 262:29-30.
- Morgan, R.A. y Anderson, W.F. 1993. Human gene therapy. *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217.
- Nowak, R. 1994. Genetic testing set for takeoff. *Science* 265:464-467.
- Rosenberg, S.A. y cols. 1993. The development of gene therapy for the treatment of cancer. *Annals Surgery* 218:455-464.
- Wivel, N.A. y Walters, L. 1993. Germ-line gene modification and disease prevention: Some medical and ethical perspectives. *Science* 262:533-538.

Utilización de la información genética: de la transcripción a la traducción

11-1 Relación entre genes y proteínas

11-2 Transcripción: el proceso básico

11-3 Transcripción y procesamiento del RNA en células eucariotas

La perspectiva humana: Posible uso de las ribozimas en medicina

11-4 Codificación de la información genética

11-5 Traducción de la información genética

La vía experimental: Papel del RNA como catalizador



FIGURA 11-A. Imagen generada por computadora de una subunidad ribosómica en la cual el RNA ribosómico aparece como una línea azul y las proteínas ribosómicas como "lluvia de estrellas" esférica. (Cortesía de Harry Noller, Universidad de California, Santa Cruz.)

El avance de la biología en el siglo pasado se reflejó de muchas maneras en nuestro concepto cambiante de la naturaleza del gen. Los trabajos de Mendel enseñaron a los biólogos que los genes son elementos discretos que controlan el desarrollo de rasgos específicos. En su oportunidad, Mendel pudo haber argumentado en favor del concepto de que cada gen determina un solo rasgo. Boveri, Weismann, Sutton y sus contemporáneos descubrieron que los genes poseían un cuerpo físico como parte del cromosoma. Morgan, Sturtevant y sus colaboradores demostraron que los genes ocupan sitios específicos: residen en lugares particulares sobre cromosomas específicos. Estos sitios permanecen constantes en cada individuo de una especie y se transmiten a la siguiente generación.

La formulación de estas ideas representó una serie de avances importantes en el camino hacia el conocimiento genético, pero aún faltaba aclarar cómo opera la información almacenada en un gen para controlar las actividades de la célula. Este es el principal tema que analizaremos en el presente capítulo. Iniciaremos estudiando algunos conceptos adicionales respecto de la naturaleza del gen para tener una idea más aproximada de su papel en la síntesis de productos codificados.

11-1 Relación entre genes y proteínas

En 1908, el médico escocés Archibald Garrod publicó que los síntomas observados en personas afectadas por ciertas

enfermedades hereditarias raras son resultado de la ausencia de enzimas específicas; este fue el primer conocimiento significativo de la función de un gen. Una de las enfermedades investigadas por Garrod, la *alcaptonuria*, es un padecimiento fácil de diagnosticar por el color oscuro que adquiere la orina cuando se expone al aire. Garrod observó en personas con alcaptonuria la ausencia en la sangre de una enzima que oxida el ácido homogentísico, compuesto formado durante el desdoblamiento de los aminoácidos fenilalanina y tirosina (fig. 11-1). El ácido homogentísico acumulado se excreta por la orina, a la cual confiere un color oscuro al ser oxidado por el aire. Garrod había descubierto la relación entre un gen específico, una enzima específica y una enfermedad metabólica específica. Denominó a estas enfermedades "errores congénitos del metabolismo". Igual como ocurrió con otras observaciones tempranas de importancia básica en genética, los descubrimientos de Garrod fueron ignorados durante decenios.

En 1940, George Beadle y Edward Tatum, del California Institute of Technology, revivieron la idea de que los genes controlan la formación de enzimas. *Neurospora* es un moho tropical del pan que en condiciones normales puede crecer en medios muy simples con una sola fuente de carbono inorgánico (p. ej., un azúcar), sales inorgánicas y biotina (una vitamina del complejo B). Puesto que sus necesidades para vivir son tan escasas, debe tener capacidad para sintetizar todos los metabolitos que requiere. Beadle y Tatum asumieron que un organismo con capacidad de síntesis tan amplia debía ser muy sensible a deficiencias enzimáticas, fáciles de descubrir mediante el protocolo experimental apropiado.

Básicamente, Beadle y Tatum irradiaron las esporas del moho y las distribuyeron de modo que cada una produjera una población genéticamente idéntica de células, y luego investigaron deficiencias metabólicas específicas en muestras de estas poblaciones utilizando el protocolo mostrado en la figura 11-2. El inicio fue por irradiación de miles de células. Dos de dichas células perdieron su capacidad de

crecer en un medio mínimo: una necesitó piridoxina (vitamina B₆) y la otra requirió tiamina (vitamina B₁). Por último, se investigó la descendencia de casi 100 000 esporas irradiadas y se aislaron docenas de diferentes tipos de mutantes. Cada mutante carecía de un gen y en consecuencia presentaba una deficiencia enzimática que impedía a la célula catalizar una reacción metabólica particular. Los resultados fueron claros: un gen específico portaba información para elaborar una enzima particular. Esta conclusión fue conocida como la hipótesis de "un gen-una enzima".

Posteriormente, cuando se supo que las enzimas a menudo se componen de más de una cadena de polipéptidos, cada una codificada por un gen diferente, el concepto se modificó a "un gen-una cadena de polipéptidos". Esta relación se aproximó mucho más a la función básica de un gen, pero tuvo que modificarse debido al descubrimiento de que un solo gen con frecuencia genera varios polipéptidos relacionados como resultado de ensamblamientos alternativos (estudiados en la sección 12-3).

Los datos de Beadle y Tatum plantearon una pregunta acerca de la naturaleza molecular del defecto ocurrido en una proteína a causa de una mutación genética. La respuesta a esta pregunta se obtuvo en 1956, cuando Vernon Ingram, de la Universidad de Cambridge, publicó un trabajo acerca de las consecuencias moleculares de la mutación causante de la anemia drepanocítica. La hemoglobina consta de cuatro grandes polipéptidos, demasiado grandes para secuenciar con la tecnología de aquella época, pero Ingram tomó un atajo. Obtuvo preparaciones aislando hemoglobina de células normales y de células drepanocíticas en cierto número de tramos específicos usando la enzima proteolítica tripsina. A continuación sometió los fragmentos del péptido a cromatografía en papel para determinar si podía diferenciar alguno de los tipos de hemoglobina normal y drepanocítica entre los productos digeridos por la tripsina. De los 30 péptidos o más presentes en la mezcla, uno migró de manera diferente en las dos preparaciones (como lo ilustrado en la figura 2-29); esta única diferencia al parecer

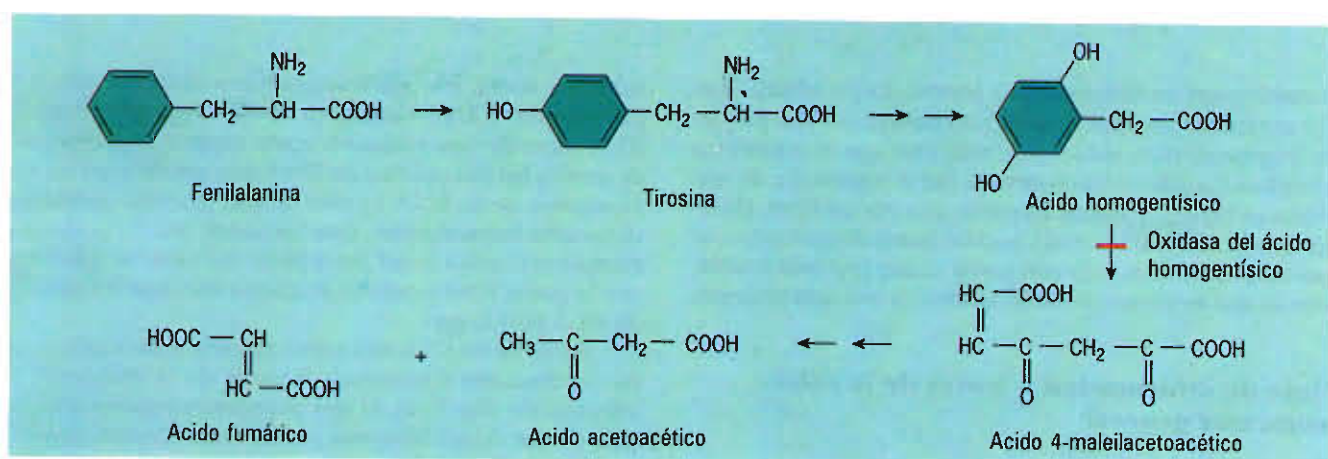


FIGURA 11-1. "Error congénito del metabolismo". Los pasos en la vía conducen al desdoblamiento de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina). Las alteraciones de la enzima oxidasa del ácido homogentísico en personas con alcaptonuria causan acumulación del ácido homogentísico en la orina.

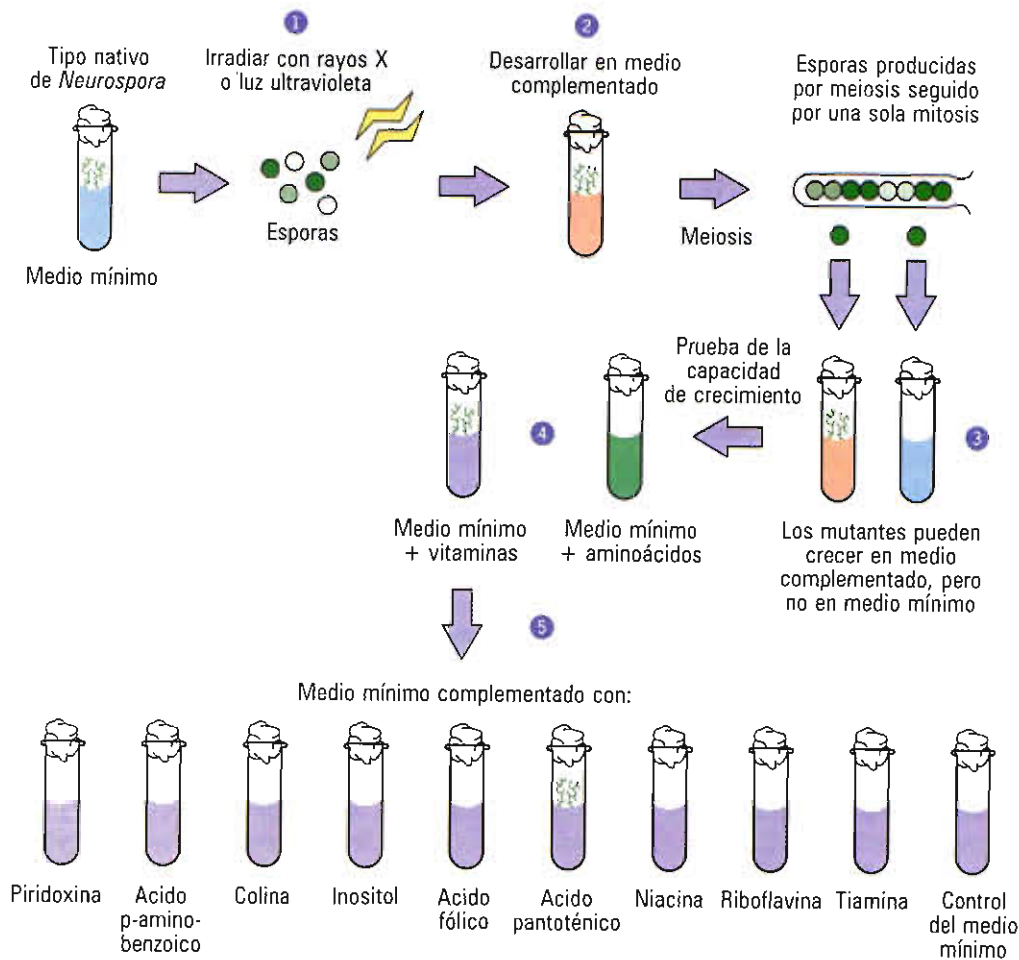


FIGURA 11-2. Experimento de Beadle y Tatum para aislar mutantes genéticos en *Neurospora*. Se irradiaron esporas para inducir mutaciones (paso 1) y luego se permitió crecer colonias en tubos que contenían medio complementario (SM) (paso 2). A continuación se probó la capacidad de esporas individuales producidas por las colonias para crecer en un medio mínimo (MM) (paso 3). Las que no crecieron eran mutantes y la tarea consistió en determinar la naturaleza del gen mutante. En el paso 4 del ejemplo mostrado se observó una muestra de células que crecen en un medio mínimo complementado con vitaminas, pero que no crecen en medio complementado con aminoácidos. Esta observación indica deficiencia de la enzima que controla la síntesis de vitaminas. En el paso 5, el crecimiento de estas mismas células en un medio mínimo complementado con una u otra de las vitaminas indica que la deficiencia reside en un gen que participa en la síntesis de ácido pantoténico (una parte de la coenzima A).

causaba todos los síntomas de la anemia drepanocítica. Una vez separados los péptidos, Ingram obtuvo un solo pequeño fragmento para secuenciar, más bien que una proteína completa. La diferencia observada fue la sustitución de una valina en la hemoglobina drepanocítica por un ácido glutámico de la molécula normal. Ingram había demostrado que una mutación en un solo gen podía causar una sola sustitución en una secuencia de aminoácidos de una sola proteína.

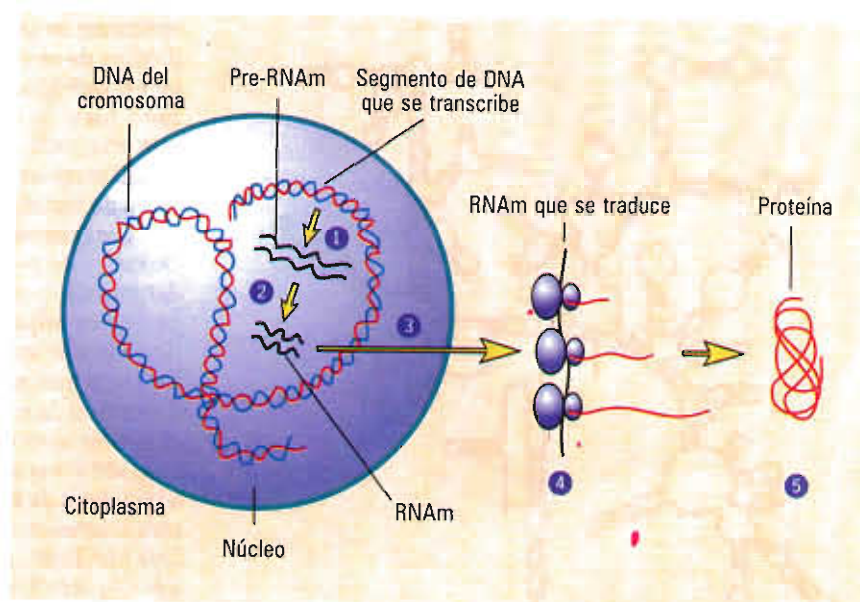
Flujo de información a través de la célula: panorama general

Hasta aquí se ha establecido la relación entre información genética y secuencia de aminoácidos, pero este conocimiento por sí solo no proporciona indicios acerca del mecanismo para generar cadenas de polipéptidos específicos. Según

sabemos ahora, hay un intermediario entre un gen y su polipéptido, el **RNA mensajero intermediario (RNAm)**. Un RNA mensajero se ensambla como copia complementaria de una de las dos cadenas de DNA que constituyen un gen. La síntesis de un RNA a partir de una plantilla de DNA se denomina **transcripción**. Esta secuencia de nucleótidos es complementaria a la del gen a partir del cual fue transcrita, por lo que el RNAm retiene la misma información contenida en el propio gen.

El uso de un RNA mensajero permite a las células separar información almacenada a partir de la utilización de información (fig. 11-3). El gen permanece almacenado, aislado dentro del núcleo como parte de una enorme molécula inmóvil de DNA, pero puede transmitir su información a un RNA móvil mucho más pequeño capaz de llegar al citoplasma. Una vez en el citoplasma, el RNAm puede servir como plantilla para controlar la incorporación de ami-

FIGURA 11-3. Flujo de información en una célula eucariota. El DNA de los cromosomas localizados en el núcleo contiene toda la información genética almacenada. Sitios seleccionados del DNA se transcriben al RNA (paso 1), que se procesa a RNA mensajero (paso 2). El RNA mensajero se transporta fuera del núcleo (paso 3) hacia el interior del citoplasma, donde se traduce en polipéptidos mediante un ribosoma que se desliza a lo largo del RNAm (paso 4). Luego de la traducción, el polipéptido se pliega para asumir su conformación nativa (paso 5).



noácidos en el orden particular codificado por la secuencia de nucleótidos del DNA y del RNAm. El uso del RNA mensajero también permite a la célula amplificar enormemente su actividad. Una molécula de DNA puede servir como plantilla para la síntesis de gran número de cadenas de polipéptidos.

Las proteínas se sintetizan en el citoplasma mediante un proceso muy complejo denominado **traducción**. La traducción requiere la participación de docenas de diferentes elementos, incluyendo ribosomas. Los ribosomas son componentes inespecíficos del mecanismo de traducción, una especie de “banco de trabajo” sobre el cual cualquier ribosoma puede traducir cualquier RNAm. Por esta razón se pueden utilizar células bacterianas como “laboratorios farmacéuticos” para elaborar proteínas codificadas por los RNAm humanos. Conforme lo analizado en la página 69, un ribosoma funcional consta de una subunidad grande y una pequeña. El ribosoma se ensambla a partir de estas subunidades en el momento de iniciar la síntesis de un polipéptido particular, y se desensambla cuando la síntesis concluye. Los ribosomas constan de RNA y proteína (como se ilustra en la fotografía de la página 434). El RNA de un ribosoma se denomina **RNA ribosómico** (o **RNAr**), e igual que los RNAm, cada uno se transcribe a partir de una cadena de DNA de un gen. En vez de capacidad de información, los RNAr desempeñan funciones estructural y catalítica.

El **RNA de transferencia** (o **RNA_t**) constituye una tercera clase principal de RNA necesario durante la síntesis de proteínas (fig. 11-3). Se requiere RNA de transferencia para traducir la información codificada en el “alfabeto” de un nucleótido de RNAm al “alfabeto” del aminoácido de un polipéptido. Los RNA_t y los RNAr son moléculas de vida media prolongada dentro de la célula (típicamente, horas a días), pero los RNAm de ordinario son inestables y su vida media se mide en minutos u horas.

El RNAr y el RNA_t deben su actividad a su capacidad para adoptar estructuras complejas secundarias y terciarias. Por lo tanto, a diferencia del DNA, que tiene una estructura relativamente definida cualquiera que sea su fuente, los RNA se pliegan en formas tridimensionales complejas, notablemente diferentes de un tipo de RNA a otro. Así pues, igual que las proteínas, los RNA pueden efectuar diversas funciones debido a que adoptan gran variedad de formas diferentes. Como en las proteínas, el plegamiento de las moléculas de RNA sigue ciertas reglas. Así como la regla principal del plegamiento de proteínas es cubrir residuos hidrofóbicos (pág. 72), una regla primaria del plegamiento del RNA es formar regiones que posean pares de bases complementarias (fig. 11-4).

En las siguientes secciones de este capítulo analizaremos con detalle las funciones del RNAm, el RNAr y el RNA_t. Las bases de la estructura material del RNA se estudiaron en la página 67.

11-2 Transcripción: el proceso básico

La transcripción es un proceso mediante el cual un tipo de ácido nucleico produce otro tipo de ácido nucleico. Por consiguiente, la transcripción es mucho más simple que la traducción y puede efectuarla una sola enzima (que trabaje en conjunto con varias proteínas auxiliares). En células procariontes y eucariotas, las enzimas encargadas de la transcripción se denominan **RNA polimerasas dependientes de DNA** o simplemente **RNA polimerasas**. Estas enzimas pueden ensamblar una cadena lineal de nucleótidos cuya secuencia es complementaria de una de las cadenas de DNA que le sirve como **plantilla**.

El primer paso en la síntesis de un RNA es la asociación de la polimerasa con la plantilla de DNA. Esto conduce a un tema de mayor interés general, a saber, las interacciones

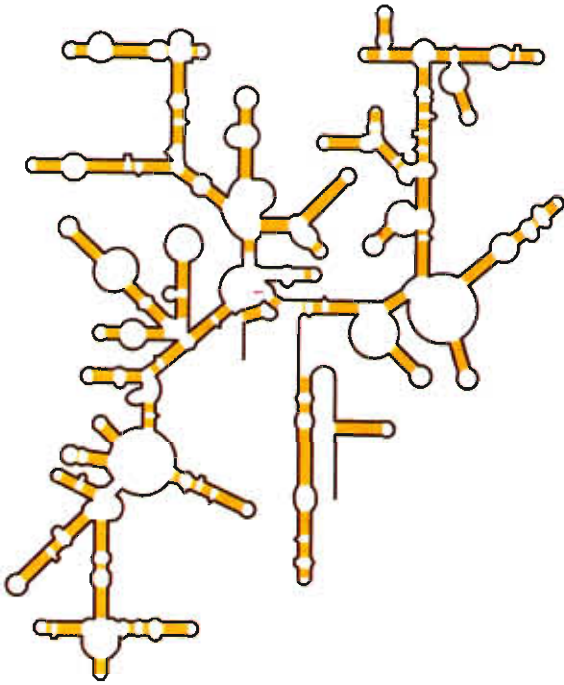


FIGURA 11-4. Estructura bidimensional de un RNA ribosómico bacteriano que muestra el extenso acoplamiento de pares de bases entre diferentes regiones de una sola cadena.

específicas de dos macromoléculas muy diferentes, proteínas y ácidos nucleicos. Así como diferentes proteínas han evolucionado para unirse a diversos tipos de sustratos y catalizar distintos tipos de reacciones, así también algunas evolucionaron para reconocer y unirse a secuencias específicas de nucleótidos en una cadena de ácido nucleico. El sitio donde se enlaza la molécula de RNA polimerasa antes de iniciar la transcripción se denomina **promotor**. Además de suministrar un sitio de enlace para la polimerasa, el promotor contiene la información que determina cuál de las dos cadenas de DNA será transcrita y el sitio donde se inicia la transcripción (fig. 11-7).

La polimerasa se desplaza en la dirección 3' a 5' a lo largo de la plantilla de la cadena de DNA ensamblando una cadena complementaria antiparalela de RNA que crece desde el extremo terminal 5' en dirección 3' (fig. 11-5, a). Las polimerasas pueden formar RNA prodigiosamente largos. En consecuencia, la enzima debe permanecer fija al DNA sobre largos tramos de la plantilla (se dice que la enzima es *de proceso*). Al mismo tiempo, la asociación de la enzima debe ser lo bastante laxa para que pueda desplazarse de un nucleótido al siguiente en la plantilla. Como se indica en la figura 11-5, b, la RNA polimerasa cataliza la reacción



en la cual los precursores trifosfato de ribonucleósido (NPPP) son hidrolizados para producir monofosfato de nucleósido

conforme se polymerizan en una cadena covalente. La hidrólisis de este enlace éster de fosfato es una reacción altamente exergónica cuyo equilibrio se encuentra muy desplazado hacia la formación de pirofosfato (PP_i). La reacción está orientada adicionalmente en esa dirección por hidrólisis del pirofosfato mediante una pirofosfatasa para formar iones de fosfato inorgánico.

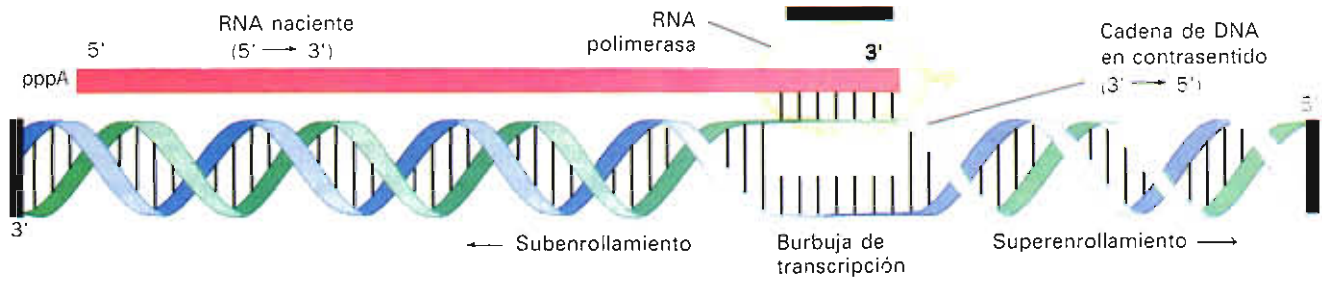
Las reacciones que conducen a la síntesis de ácidos nucleicos (y de proteínas) son intrínsecamente diferentes a las del metabolismo intermediario estudiadas en el capítulo 3, ya que es imperativo que la reacción proceda en una sola dirección; o sea, la reacción es prácticamente irreversible. En tanto que algunas de las reacciones que conducen a la formación de moléculas pequeñas, como aminoácidos, pueden estar muy cercanas al equilibrio que pueda medir una reacción inversa considerable, las reacciones que conducen a la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas deben ocurrir en condiciones donde prácticamente no haya reacción inversa. Esta condición puede cumplirse si se acoplan estas reacciones a la hidrólisis altamente exergónica de moléculas como el pirofosfato.

Conforme se desplaza la polimerasa a lo largo de la plantilla debe introducir el nucleótido apropiado en cada sitio de la cadena creciente. La enzima presumiblemente puede seleccionar el trifosfato de ribonucleósido complementario que debe incorporar gracias a la capacidad del nucleótido para formar la estructura estereoquímica apropiada con el nucleótido en la cadena de DNA que se transcribe (fig. 11-5, b). Una vez que la polimerasa pasa sobre un sitio particular, se reconstituye la doble hélice de DNA (como en la figura 11-5, a); la cadena de RNA no permanece asociada a su plantilla como un híbrido de DNA-RNA (excepto para unos cuantos nucleótidos justo detrás del sitio donde la polimerasa está operando). Una polimerasa de RNA bacteriano puede incorporar unos 50 nucleótidos por segundo a una molécula de RNA en crecimiento. La microfotografía electrónica de la figura 11-5, c, muestra una molécula de DNA de un fago con cierto número de moléculas de RNA polimerasa enlazadas.

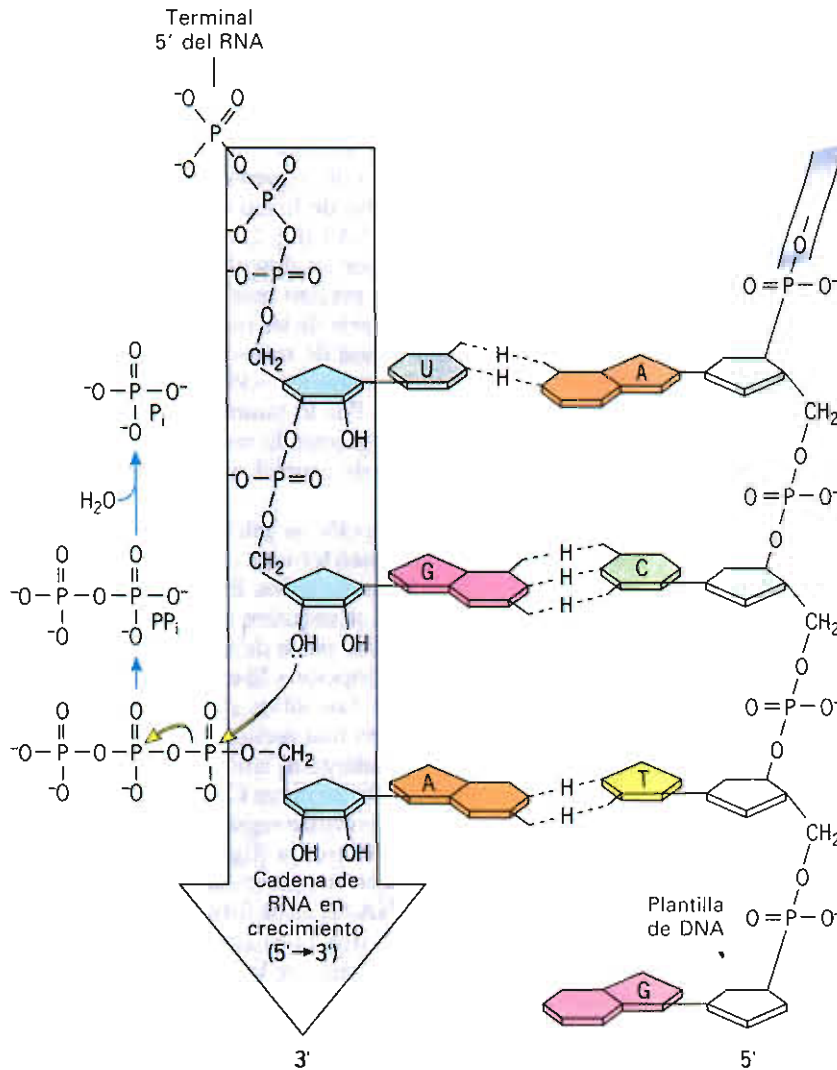
En este punto del análisis es necesario diferenciar los procesos de transcripción en células procariotas y eucariotas.

Transcripción en procariotes

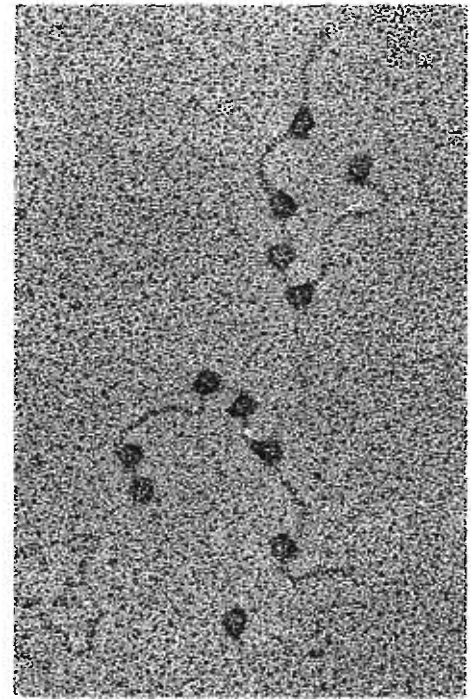
Las células procariotas contienen un solo tipo de RNA polimerasa compuesta de cinco subunidades firmemente asociadas para formar un **núcleo enzimático central**. Si este núcleo enzimático se purifica a partir de células bacterianas y se añade a una solución de moléculas de DNA bacterianas y ribonucleótidos, la enzima se une al DNA y sintetiza RNA. Sin embargo, las moléculas de RNA producidas por la polimerasa purificada no son iguales a las encontradas dentro de la célula porque el núcleo enzimático se fija a sitios inapropiados en el DNA, sitios que normalmente serían ignorados en la célula. Sin embargo, si a la RNA polimerasa se añade un polipéptido accesorio purificado llamado *factor sigma* (σ) antes de fijarse al DNA, la transcripción comienza en los sitios apropiados (fig. 11-6). La fijación del factor sigma al núcleo enzimático aumenta la afinidad de la enzi-



(a)



(b)



(c)

FIGURA 11-5. Alargamiento de la cadena durante la transcripción. *a)* Modelo esquemático del alargamiento de una molécula de RNA recién sintetizada durante la transcripción. En este modelo, el DNA gira conforme genera el transcrito y por lo tanto sufre arrollamiento excesivo por delante del sitio de incorporación del nucleótido y desenrollamiento detrás de ese sitio. Este modelo se basa en la suposición de que tanto la polimerasa como el DNA se encuentran fijos al núcleo del armazón estructural interno (indicado por las barras negras), lo que evita su rotación. La cadena de DNA transcrita se denomina cadena en contrasentido porque es complementaria de la de RNA, que contiene la información (determina el sentido). *b)* El alargamiento de la cadena ocurre como resultado de un ataque por el 3' OH del nucleótido al extremo de la cadena en crecimiento sobre el 5' α fosfato del trifosfato de nucleósido en crecimiento. El pirofosfato liberado se desdobla a continuación impulsando aún más la tendencia de la reacción hacia la polimerización. La geometría del acoplamiento de bases entre el nucleótido de la cadena de la plantilla y el nucleótido en crecimiento determina cuál de los cuatro posibles trifosfatos de nucleósido se incorporan a la cadena de RNA en crecimiento en cada sitio. *c)* Micrografía electrónica de varias moléculas de RNA polimerasa enlazadas a la plantilla de DNA del fago. (*a)* Según B. F. Fitch, Trends Genet. 4:271-272, 1988; *c)* cortesía de R.C. Williams.)

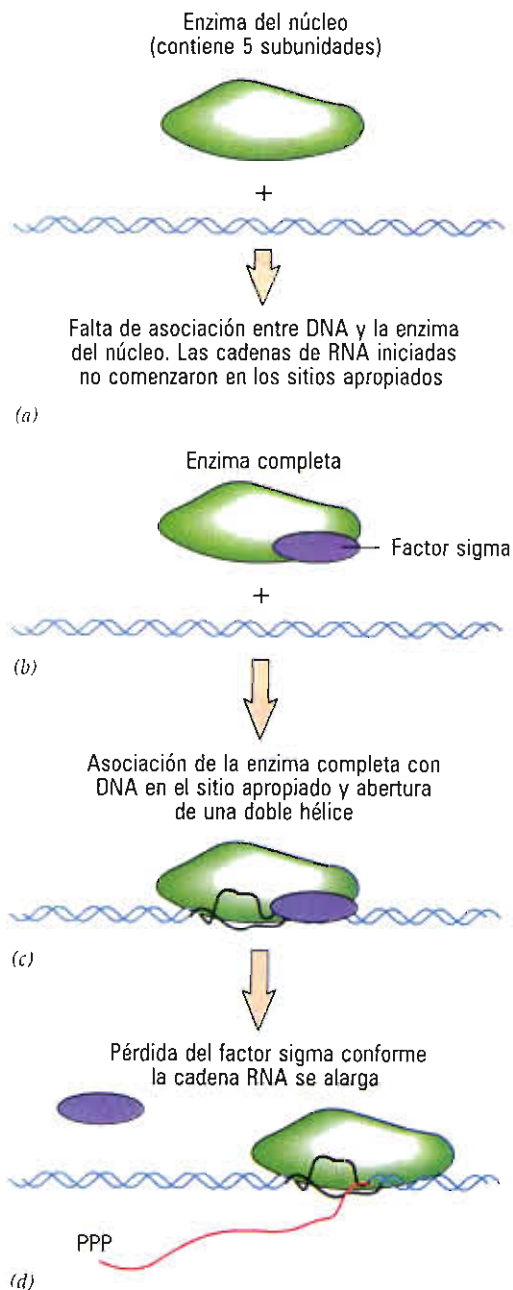


FIGURA 11-6. Inicio de la transcripción en procariotes. *a)* En ausencia del factor sigma, la enzima central no puede interactuar con el DNA en los sitios específicos de inicio. *b-d)* Cuando la enzima central se asocia al factor sigma inicia la síntesis de RNA en los sitios apropiados. Después el factor se disocia de la enzima central, que entonces puede sufrir alargamiento.

ma por los sitios promotores sobre el DNA y disminuye su afinidad general por DNA. Una vez iniciada la transcripción, la subunidad sigma se separa de la plantilla de DNA, en tanto que la polimerasa continúa ensamblando una cadena de RNA complementaria.

Los promotores bacterianos se localizan en la región de una cadena de DNA, justo antes (o en la parte alta) del sitio

donde se inició la síntesis de RNA.¹ El análisis de las secuencias de DNA en la parte alta de numerosos genes bacterianos indica dos tramos cortos similares de un gen al otro. Uno de dichos tramos contiene alrededor de 35 bases en la parte alta a partir del sitio de inicio y ocurre como una variación de la secuencia TTGACA (fig. 11-7). Este sitio (conocido como región -35) es la secuencia reconocida por el factor sigma relacionado con la polimerasa. Las células bacterianas poseen varios factores sigma diferentes que reconocen diversas versiones de la secuencia -35. El uso de diferentes factores sigma es un mecanismo que la célula utiliza para seleccionar una batería particular de genes para posible transcripción. Por ejemplo, cuando las células *E. coli* se someten a una súbita elevación de temperatura, sintetizan un nuevo factor sigma que reconoce una secuencia promotora distinta, lo que conduce a la transcripción de una batería de genes de choque térmico.

La segunda secuencia de consenso se presenta unas 10 bases hacia arriba del sitio de inicio y ocurre como variación de la secuencia TATAAT (fig. 11-7). Este sitio, denominado *segmento Pribnow* por su descubridor, se encarga de identificar el nucleótido preciso que iniciará la transcripción. Aunque la mayor parte de las mutaciones en regiones promotoras reducen la tasa de transcripción, ciertas sustituciones de bases en las regiones -35 y -10 pueden incrementar mucho esa tasa. Por lo tanto, los promotores son algo más que simples regiones de reconocimiento; actúan como importantes sitios de control para regular la tasa de expresión de genes.

Así como la transcripción se inicia en puntos específicos del cromosoma, también termina cuando se alcanza una secuencia específica de nucleótidos. En algunos casos, para concluir la transcripción se requiere una proteína llamada *factor rho*, pero en la mayor parte de los casos la polimerasa puede detener la transcripción y liberar la cadena de RNA sin factores adicionales. Los sitios de terminación independientes de rho poseen una secuencia notablemente similar en la región precedente al sitio de conclusión. Esta región incluye dos tramos de pares G-C dispuestos en forma de un par repetido invertido seguido por una hilera de adeninas en la cadena transcrita (fig. 11-8). Como consecuencia de esta simetría en su secuencia de bases, se asume que el extremo 3' del RNA naciente forma una asa en forma de gancho para el cabello (fig. 11-8) que impide el avance de la enzima. Los datos indican que la polimerasa se detiene cuando llega a esta región. Esto suministra un buen ejemplo de la importancia de la estructura secundaria del RNA. Se cree que el tramo de nucleótidos del DNA que contiene adenina facilita la liberación de la cadena de RNA, puesto que los pares de bases formados entre la U de una cadena de RNA y una A de la cadena de DNA son especialmente débiles. Las mutaciones: 1) que debilitan la estructura del asa en forma de gancho de cabello, o 2) que fortalecen la interacción entre la plantilla de DNA y el RNA transcrito en

¹ El nucleótido donde se inicia la transcripción se denomina +1 y crece en dirección hacia arriba, que se escribe a la derecha. El nucleótido que precede al sitio de inicio se denomina -1 y el número se vuelve cada vez más negativo en dirección hacia arriba (a la izquierda).

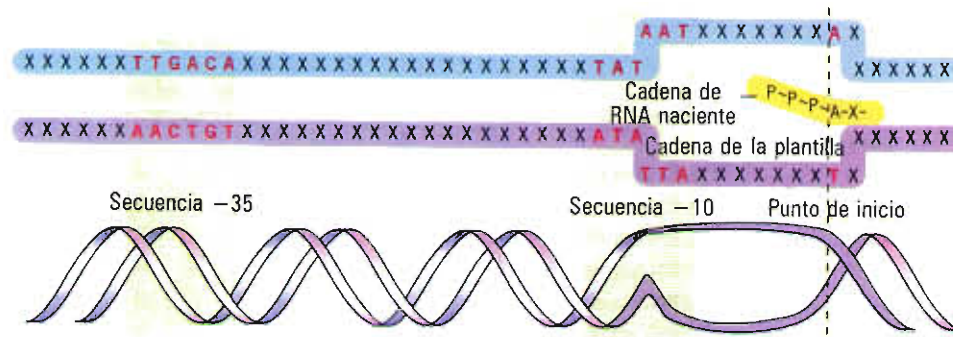


FIGURA 11-7. Elementos básicos de una región promotora en el DNA de una bacteria *E. coli*. La secuencia reguladora clave requerida para el inicio de la transcripción se observa en regiones localizadas a -35 y -10 pares de bases a partir del sitio donde se inicia la transcripción.

la región rica en U, pueden ser causa de que la polimerasa lea el sitio de terminación.

11-3 Transcripción y procesamiento del RNA en células eucariotas

Las células eucariotas poseen tres enzimas transcriptoras distintas, cada una encargada de la síntesis de diferentes grupos de RNA. La **RNA polimerasa I** sintetiza RNA ribosómico grande (28S, 18S y 5.8S); la **RNA polimerasa II** sin-

tetiza RNA mensajero y la mayor parte de los RNA nucleares pequeños (estudiados más adelante); y la **RNA polimerasa III** sintetiza RNA de bajo peso molecular, incluyendo varios RNA de transferencia y el RNA ribosómico 5S. No se han encontrado procariotes con RNA polimerasas múltiples, en tanto que los eucariotes más simples (levaduras) poseen los mismos tres tipos presentes en células de mamíferos. Esta diferencia en el número de RNA polimerasas es otra aguda diferencia entre los dos tipos de células.

Las polimerasas eucariotas son enzimas sumamente complejas que contienen de ocho a 14 polipéptidos distintos

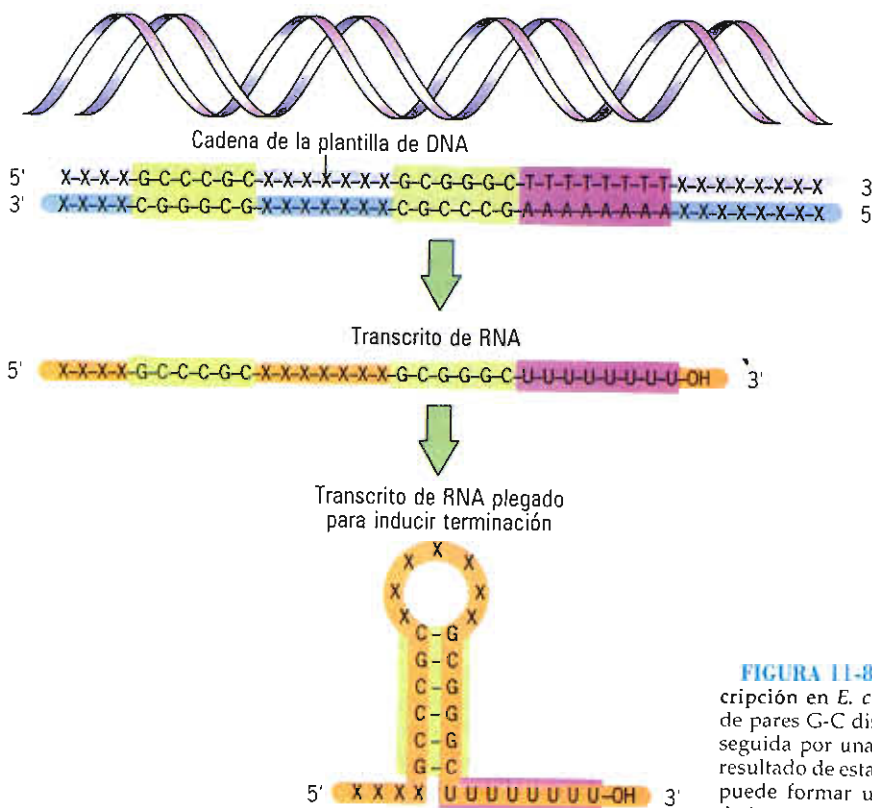


FIGURA 11-8. Terminación independiente de Rho de la transcripción en *E. coli*. La región de terminación contiene dos tramos de pares G-C dispuestos en forma de una unidad repetida inversa seguida por una hilera de adeninas en la cadena transcrita. Como resultado de esta secuencia de bases, el extremo 3' del RNA naciente puede formar una asa en forma de gancho para el cabello, que detiene el movimiento de la RNA polimerasa.

CUADRO 11-1. Los RNA nucleares pequeños

RNA	Función	Abundancia (copias/célula)	RNA polimerasa
Nucleoplasma			
U1	Pre-RNA _m ensamblador	1×10^6	II
U2	Pre-RNA _m ensamblador	5×10^5	II
U4	Pre-RNA _m ensamblador	2×10^5	II
U5	Pre-RNA _m ensamblador	2×10^5	II
U6	Pre-RNA _m ensamblador	4×10^5	III
U7	Histona pre-RNA _m ensamblador	5×10^3	II
U11	Desconocida	1×10^4	II
U12	Desconocida	5×10^3	II
7SK	Desconocida	2×10^5	III
8-2	Pre-RNA _t de procesamiento (Rnasa)	1×10^5	III
Nucléolo			
U3	Pre-RNA _r de procesamiento	2×10^5	II*
U8	Desconocida	4×10^4	II
U13	Desconocida	1×10^4	II
7-2	Desconocida	1×10^5	III

* U3 se sintetiza por acción de la RNA polimerasa III en plantas.

FUENTE: S.J. Baserga y J.A. Steitz, *RNA World*, R.F. Gesteland y J.F. Atkins, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993.

(subunidades), y son lo bastante grandes para visualizarse con facilidad en las micrografías electrónicas (fig. 11-5, c). Además de las subunidades que constituyen las enzimas, cada una de las polimerasas se auxilia durante su operación con varias proteínas auxiliares denominadas **factores de transcripción**. Se pueden distinguir dos categorías amplias de factores de transcripción: **factores generales de transcripción**, requeridos para que la polimerasa inicie la transcripción, y **factores específicos de transcripción** (o **proteínas reguladoras de genes**) que determinan la tasa de transcripción de un gen o grupo *particular* de genes. El mecanismo de acción de los factores específicos de transcripción se encuentra en el verdadero centro del proceso de expresión selectiva de genes y se analiza con detalle en el capítulo 12.

Los tres tipos de RNA polimerasa eucariota pueden distinguirse según su sensibilidad a la α -amanitina, octapéptido sumamente tóxico (ocho aminoácidos unidos). La α -amanitina se aísla de un hongo venenoso común, *Amanita phalloides*, que también es fuente de la faloidina, toxina para microfilamentos (pág. 357). La actividad de la RNA polimerasa II es muy sensible a la amanitina-alfa, en tanto que la RNA polimerasa I no es afectada por ese compuesto. La RNA polimerasa III se inhibe en menor grado que la RNA polimerasa II. Una persona envenenada por ingestión de estos hongos no muestra síntomas inmediatos, sino que la función hepática se deteriora en los días subsecuentes debido a la falta de producción de un nuevo RNA_m necesario para controlar la síntesis continua de proteínas. En casos graves, la única manera de salvar la vida de la persona puede ser un trasplante hepático.

Los tres principales tipos de RNA se derivan de moléculas de un precursor de RNA considerablemente mucho

mayor que el producto RNA “maduro”. La molécula de RNA inicialmente sintetizada, de longitud equivalente a la longitud completa del DNA transcrito, se denomina **transcrito primario**, o **pre-RNA**. El segmento de DNA correspondiente sobre el cual se transcribe el transcrito primario se denomina **unidad de transcripción**. Típicamente, los transcritos primarios tienen existencia fugaz y son **procesados** para formar RNA funcional más pequeño mediante una serie de reacciones de procesamiento.

El procesamiento del RNA requiere varios RNA pequeños (90 a 300 nucleótidos de largo) y sus proteínas relacionadas. Los RNA se denominan **RNA nucleares pequeños (RNA_{np})** debido a su corto tamaño y a que funcionan dentro del núcleo. No hay más de una docena de diferentes RNA_{np}; las especies mejor definidas se muestran en el cuadro 11-1. (La U en el nombre del RNA indica que es rico en nucleótidos que contienen uracilo.) En las siguientes secciones examinaremos las actividades relacionadas con la transcripción y procesamiento de cada uno de los RNA eucariotas principales.

RNA ribosómico

En la página 408 se mencionó el DNA que codifica al RNA ribosómico como parte de una fracción moderadamente repetida del genoma. Las células eucariotas contienen millones de ribosomas, cada uno con varias moléculas de RNA_r junto con docenas de proteínas ribosómicas. En realidad, más de 80% del RNA de una célula consta de RNA ribosómico. Para suministrar a la célula un número tan grande de transcritos, las secuencias de DNA que codifican

RNAr normalmente se repiten cientos de veces. Este DNA, llamado DNAr, de ordinario se agrupa en una o unas pocas regiones del genoma (fig. 11-9). En la célula en interfase (o sea, que no se encuentra en estado de división), los racimos de DNAr se agrupan como parte de una o más estructuras nucleares de forma irregular denominadas **nucléolos**, que funcionan como organelos productores de ribosomas. Los nucléolos desaparecen durante la mitosis y luego reaparecen en el núcleo de las células hijas alrededor de las partes del genoma que contienen genes de RNA ribosómico. Por consiguiente, las regiones del cromosoma que contienen DNAr se denominan *organizadores nucleolares*.

Como se indicó en la micrografía electrónica de la figura 11-10, la masa del nucléolo se compone de partículas de unos 15 a 20 nm de diámetro que confieren al nucléolo un aspecto granuloso. Integrados en esta masa granular se encuentran uno o más corpúsculos redondos que consisten principalmente en material fibrilar. En breve mostraremos la base molecular de las regiones fibrilar y molecular.

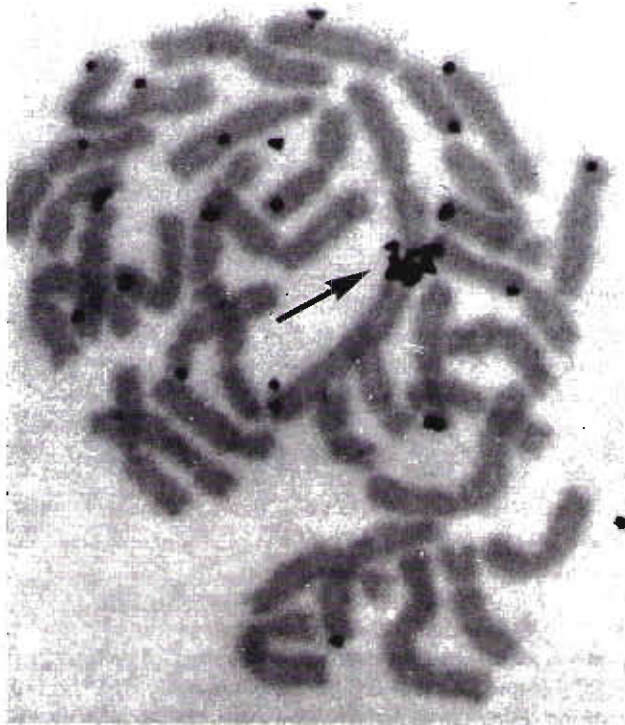


FIGURA 11-9. Localización experimental mediante hibridación *in situ* del DNA que codifica RNA ribosómico en el anfibio *Xenopus*. Se aisló DNA ribosómico y se utilizó como plantilla para sintetizar RNA *in vitro* complementario marcado con isótopos radiactivos. A continuación el RNA marcado se hibridizó con DNA desnaturalizado de una preparación de cromosomas de *Xenopus*, y la localización de la radiactividad enlazada se determinó mediante autorradiografía. El DNA que codifica RNAr se localiza en uno o más sitios donde se forman nucléolos (por lo tanto, estos sitios se denominan organizadores nucleolares). Puesto que los organizadores nucleolares de ambos miembros de un par homólogo de cromosomas *Xenopus* se unen entre sí, la radiactividad aparece localizada en un sitio sobre el juego de cromosomas (flecha). (Según Mary Lou Pardue, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38:476, 1973.)

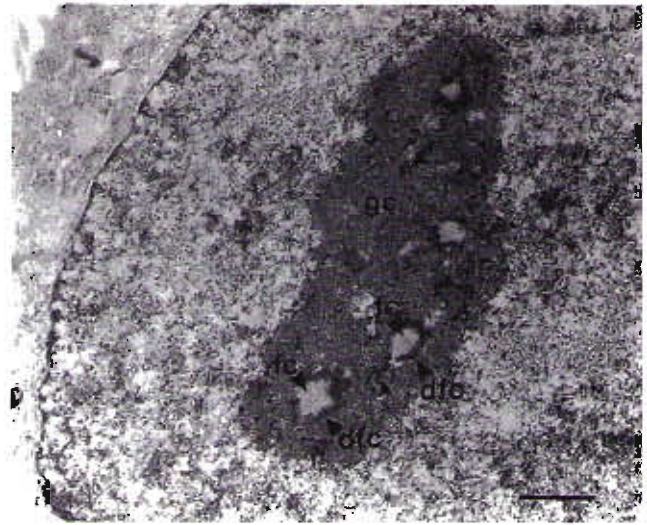


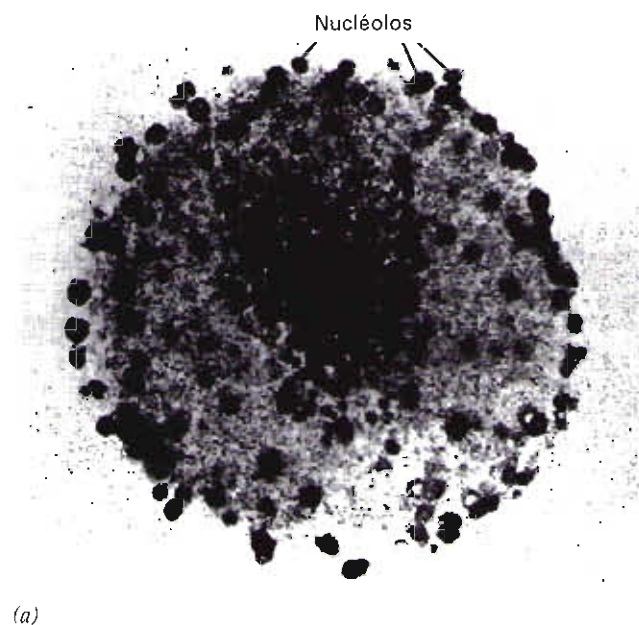
FIGURA 11-10. Estructura del nucléolo. Micrografía electrónica de una sección del núcleo con su nucléolo. La masa del nucléolo consta de un componente granular (gc). Integrados dentro de los gránulos se encuentran centros fibrilares (fc) rodeados por un componente fibrilar más denso (dfc). Según un modelo actual, la transcripción del precursor RNA ribosómico tiene lugar en el borde situado entre fc y dfc. Barra, 1 μ m. (Según Pavel Hozak y cols. J. Cell Science 107:641, 1994; con permiso de Company of Biologists Ltd.)

Síntesis de los precursores de RNAr

De ordinario, los oocitos son células muy grandes (p. ej., 100 μ m de diámetro); los de anfibio en general son enormes (más de 2.5 mm de diámetro). Durante el desarrollo de oocitos de anfibios, el DNAr se amplifica selectivamente y aumenta mucho el número de nucléolos que alojan los genes de RNAr (fig. 11-11, a). Este paso de amplificación del DNA es necesario para suministrar el gran número de ribosomas necesarios para que el huevo fertilizado inicie su desarrollo embrionario. Debido a que estos oocitos contienen cientos de nucléolos, cada uno elaborando activamente RNAr, son sujetos ideales para estudiar síntesis y procesamiento de los RNAr.

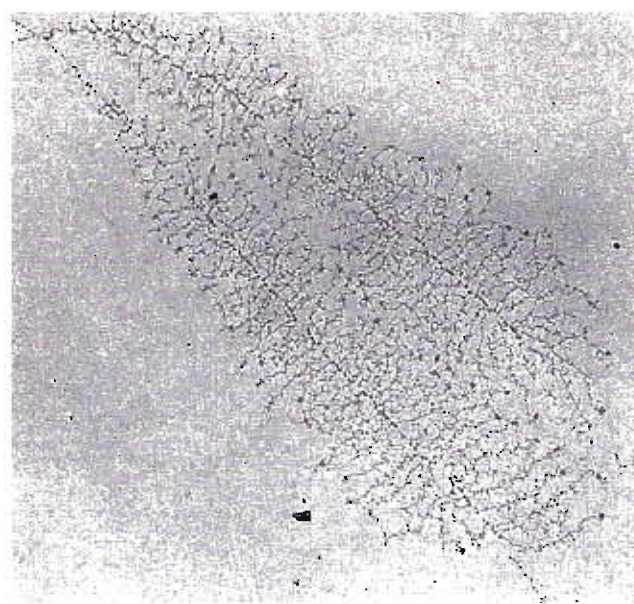
Los centros fibrilares de los nucléolos del oocito se pueden apartar cuidadosamente para revelar la presencia de una fibra circular. Cuando se examina esta fibra en el microscopio electrónico muestra un aspecto que recuerda una cadena de "árboles de Navidad" (fig. 11-11, b). El examen de una parte de la fibra con mayor amplificación (fig. 11-11, c) revela algunos aspectos de la actividad nucleolar y la síntesis de RNA ribosómico.

1. La micrografía de la figura 11-11, b, muestra genes distintos para RNA ribosómico situados uno después del otro a lo largo de una molécula simple de DNA, lo que revela la disposición en fila de los genes de RNAr repetidos.
2. La micrografía de la figura 11-11, b, muestra una imagen estática de lo que ocurre en el nucléolo. Podemos interpretar esta fotografía para obtener mayor información respecto del proceso de transcripción del RNAr. Cada una de las casi 100 fibrillas que surgen del DNA como rama del "árbol de Navidad" es un transcrito del RNAr naciente sorprendido en el acto de alargamiento.



(b)

2 μm



(c)

0.5 μm

FIGURA 11-11. Síntesis del RNA ribosómico. *a)* Micrografía tomada con microscopio de luz de un núcleo aislado de un oocito de *Xenopus* teñido para revelar los cientos de nucléolos. *b)* Micrografía electrónica de un segmento de DNA aislado de uno de los nucléolos de un oocito de *Xenopus*. El DNA (llamado DNAr) contiene los genes que codifican los dos RNA ribosómicos grandes, seccionados de un solo transcrito primario. Se muestran varios genes, cada uno en el proceso de transcripción, lo cual se manifiesta por las fibrillas fijadas al DNA. Estas fibrillas constan de RNA naciente y proteínas relacionadas. Los tramos de DNA entre los genes transcritos son espaciadores no transcritos. *c)* Vista más cercana de dos genes nucleolares en el momento de ser transcritos. La longitud del transcrito primario de RNAr en crecimiento aumenta conforme crece la distancia a partir del punto de inicio. Se pueden observar las moléculas de RNA polimerasa como puntos en la base de cada fibrilla. (*a:* Según David D. Brown e Igor B. Dawid, *Science* 160:272, 1968; copyright 1968 por American Association for the Advancement of Science. *b-c:* cortesía de Oscar L. Miller, Jr. y Barbara R. Beatty.)

El gránulo oscuro en la base de cada fibrilla, visible con mayor resolución en la fotografía de la figura 11-11, *c*, es la molécula de la RNA polimerasa I encargada de la formación de dicho transcrito. La longitud de las fibrillas aumenta gradualmente de un extremo al otro del “tronco del árbol de Navidad”. Las fibrillas más cortas son moléculas de RNA con menor número de nucleótidos fijos a moléculas de polimerasa que a su vez están enlazadas al DNA más próximo al sitio de inicio de la transcripción. Cuanto más larga la fibrilla más cerca se encuentra de completar el transcrito. La longitud del DNA entre las fibrillas de RNA más cortas y más largas corresponde a una sola unidad de transcripción. El promotor se sitúa justo arriba del sitio donde se inicia la transcripción. La elevada densidad de las moléculas de

RNA polimerasa a lo largo de cada unidad de transcripción (casi una cada 100 pares de bases de DNA) refleja la elevada tasa de síntesis de RNAr en los nucléolos de estos oocitos.

3. En las micrografías electrónicas se puede observar que las fibrillas de RNA contienen grumos y partículas acompañantes. Estas partículas constan de RNA y proteína que participan en la conversión de los precursores de RNAr a su producto final RNAr y su ensamblado en subunidades ribosómicas.
4. En la figura 11-11, *b*, se puede notar que la región de la fibra de DNA entre unidades de transcripción adyacentes está desprovista de cadenas de RNA nacientes. Debido a que esta región de agrupamientos de genes ribosómicos no se transcribe, se le conoce como **espa-**

ciador no transcrito. Los espaciadores no transcritos se presentan en varias unidades repetidas, grupos de genes, incluyendo los de RNAt, e histonas. Debido a su organización en fila, todos los genes del grupo pueden estar bajo control común, de modo que se puede echar a andar o desconectar simultáneamente toda una batería de genes.

Procesamiento del precursor de RNAr

Los ribosomas eucariotas tienen cuatro RNA ribosómicos distintos, tres en la subunidad grande y uno en la subunidad pequeña. En el hombre, la subunidad grande contiene una molécula RNA 28S, una 5.8S y una 5S, en tanto que la subunidad pequeña contiene una molécula RNA 18S.² Tres de estos RNAr (28S, 18S y 5.8S) se derivan de un solo transcrito primario (denominado *pre-RNA*), mostrado en la figura 11-12. El RNAr 5S se sintetiza a partir de un precursor RNA separado fuera del nucléolo. Iniciaremos con el primer grupo de tres.

Durante el procesamiento, varias enzimas que hidrolizan enlaces fosfodiéster específicos del esqueleto de RNA desdoblan el *pre-RNA*. Una de las peculiaridades del *pre-RNA*, en comparación con otros transcritos de RNA, es su alto grado de metilación. En el momento que el precursor *pre-RNA* sufre su primer desdoblamiento, más de 100 grupos metilo se han añadido ya a la molécula. Casi todas las metilaciones ocurren sobre la ribosa, aunque unos pocos

radicales metilo se colocan sobre bases específicas. Los nucleótidos que contienen los grupos metilo se localizan en posiciones específicas y se agrupan en porciones de la molécula. Todos los nucleótidos del *pre-RNA* metilados permanecen como parte de los productos finales, en tanto que las secciones no metiladas se destruyen durante el procesamiento. La presencia de los grupos metilo probablemente proteja estas regiones del RNA contra el desdoblamiento enzimático, sea directamente o como resultado de cambios impuestos a la estructura secundaria del RNA.

Debido a que el RNAr sufre una metilación tan intensa, se puede seguir su síntesis incubando células con el aminoácido metionina, cuyos grupos metilo se marcan con isótopos radiactivos. La metionina se emplea en el metabolismo como grupo donador de metilo; el grupo metilo se transfiere a la metionina mediante la acción de varias enzimas sobre un aceptor específico, incluyendo el *pre-RNA*. Cuando se suministra ¹⁴C-metionina a un cultivo de células de mamífero durante breve tiempo, se incorpora una fracción considerable de radiactividad a la molécula de RNA 45S, que corresponde a una longitud de casi 13 000 nucleótidos. El RNA 45S es precursor de las moléculas 28S, 18S y 5.8S. La longitud combinada de los tres RNAr maduros es de aproximadamente 7 000 nucleótidos, poco más de la mitad del transcrito primario.

Los intermediarios formados a lo largo de la vía de procesamiento, desde el *pre-RNA* 45S hasta el RNAr maduro, se pueden descubrir incubando brevemente células de mamífero con metionina marcada y luego siguiendo las células en un medio no marcado durante diferentes periodos (fig. 11-13). En este tipo de experimento, la primera especie en ser marcada es el transcrito primario 45S, observado luego de 10 minutos como un pico de radiactividad (línea punteada) en la fracción de RNA nucleolar. Luego de un breve periodo, la radiactividad aparece en varias moléculas de

² El valor S (o unidad Svedberg) se refiere al coeficiente de sedimentación del RNA; cuanto mayor sea el número, más rápidamente se desplaza la molécula a través de un campo de fuerza durante la centrifugación y (para un grupo de moléculas químicamente similares) mayor será el tamaño de la molécula. Los RNA 28S, 18S, 5.8S y 5S consisten en nucleótidos de longitud aproximada a 5 000, 2 000, 160 y 120 nucleótidos, respectivamente.

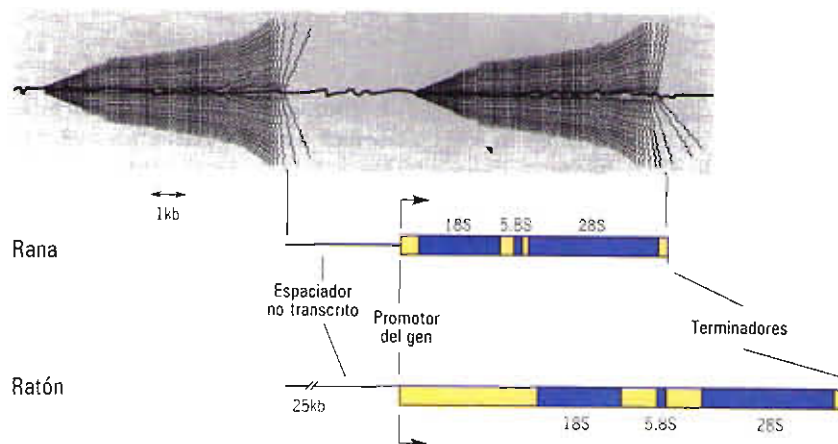


FIGURA 11-12. Unidad de transcripción del RNAr. La parte superior del dibujo muestra el aspecto de una porción del DNA procedente de un nucléolo conforme es transcrito por el RNAr. En la parte inferior se ilustra una de las unidades de transcripción que codifica el RNAr en *Xenopus* y en el ratón. Las partes del DNA que codifican los productos RNAr maduros se muestran en azul. Las regiones de espaciador transcrito, o sea, porciones del DNA transcritas pero cuyos RNA correspondientes son degradados durante el procesamiento se muestran en amarillo. El espaciador no transcrito, situado entre las unidades de transcripción, contiene la región promotora en el lado 5' del gen y un amplificador (una región de DNA que aumenta la velocidad de transcripción). (Según B. Sollner-Webb, Trends Biochem. Sci. 16:59, 1991.)

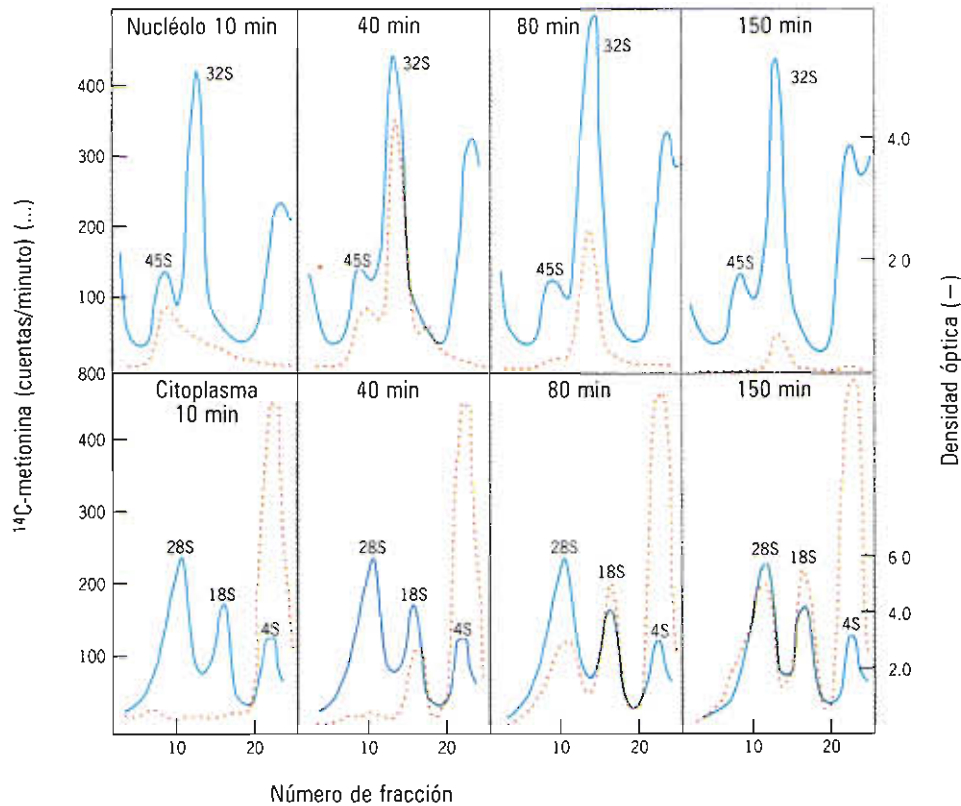


FIGURA 11-13. Análisis cinético de la síntesis y procesamiento del RNAr. Durante 10 minutos se incubó un cultivo de células de mamífero con metionina marcada con ^{14}C y a continuación se observó en un medio sin radiactividad durante diferentes periodos, como se indica en cada recuadro. Después del seguimiento, las células se lavaron para liberarlas del isótopo y se homogeneizaron para preparar las fracciones nucleolar y citoplásmica. De cada fracción se extrajo RNA que se analizó mediante ultracentrifugación para separar el RNA según su tamaño (cuanto más grande el RNA, más próximo se encuentra al fondo del tubo, el cual corresponde a la fracción 1). La línea continua representa la absorbancia UV de cada fracción celular que suministra una medida de la cantidad de RNA de cada tipo. Este perfil de absorbancia no cambia con el tiempo. La línea punteada muestra la radiactividad en diferentes momentos durante el seguimiento. Las gráficas de RNA nucleolar (perfiles de arriba) muestran la síntesis del precursor RNAr 45S y su subsecuente conversión a una molécula 32S, un precursor del RNAr 28S. Los otros productos principales del precursor 45S dejan el núcleo con gran rapidez y, por lo tanto, no se muestran de manera prominente en el RNA nucleolar. Los perfiles de abajo muestran el curso temporal de la aparición de las moléculas de RNAr maduras en el citoplasma. El RNAr 18S aparece en el citoplasma mucho antes que las especies 28S de mayor tamaño, lo que se correlaciona con la rápida salida del primero desde el nucléolo. (Según H. Greenberg y S. Penman, *J. Mol. Biol.* 21:531, 1966.)

RNA más pequeñas (fig. 11-13), lo que indica el desdoblamiento del precursor más grande en productos en la vía hasta la formación de las especies de RNA maduras. El intermediario de vida más prolongada sedimenta a 32S y se observa como un pico distinto en el RNA nucleolar luego de 40 a 150 minutos. El RNA 32S sirve como precursor del RNAr 28S. Una de las vías en el procesamiento de la transcripción primaria de RNAr se indica en la figura 11-14.

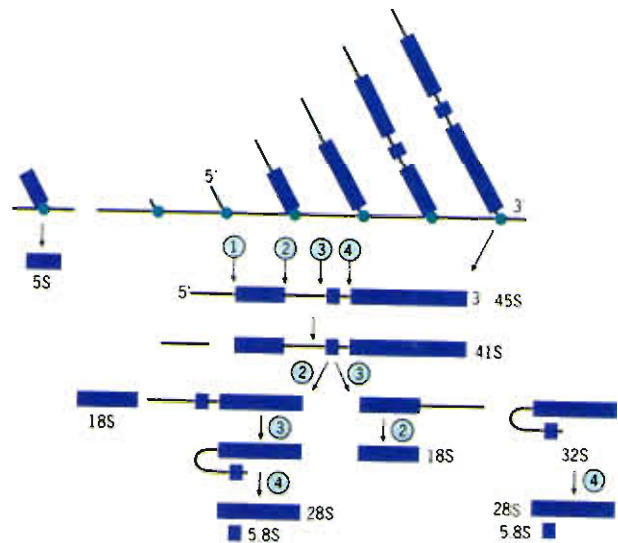
El procesamiento del pre-RNAr se efectúa conforme la molécula se asocia firmemente a las partículas de ribonucleoproteína (RNP), lo cual, como se indica en la micrografía de la figura 11-11, c, ocurre incluso antes de completarse la transcripción del precursor 45S. Las partículas de ribonucleoproteínas se ensamblan en el citoplasma y posteriormente se desplazan al interior del núcleo y después a los nucléolos. La primera partícula RNP que se fija al transcrito RNAr contiene el RNAsn U3 que se enlaza al extremo terminal 5' del transcrito RNAr. Esta partícula de RNA se puede obser-

var como una "pelota" situada en el extremo externo de las fibrillas de RNA nacientes mostradas en la figura 11-11, c, donde cataliza la eliminación del extremo 5' del transcrito (fig. 11-14).

El nucléolo no sólo es sitio de procesamiento de RNAr, sino también de ensamblado de las dos subunidades ribosómicas. Por consiguiente, conforme se procesa el RNA se asocian dos tipos de proteínas: las proteínas que permanecerán en la subunidad ribosómica y las proteínas del nucléolo que interactúan transitoriamente con los RNAr intermedios y sólo se requieren para el procesamiento. Además de las enzimas que desdoblan con éxito al RNA, se cree que este último grupo también contiene proteínas que protegen los sitios donde ocurre el desdoblamiento y otras que hacen a dichos sitios más accesibles al procesamiento enzimático.

Iniciaremos esta sección acerca de la síntesis del RNAr con una descripción de la estructura microscópica del nucléolo, al cual regresamos. El nucléolo tiene estructura

FIGURA 11-14. Esquema para el procesamiento del RNA ribosómico de mamíferos. El transcrito primario para RNAr es una molécula 45S de casi 13 kilobases. Los cuatro principales sucesos de desdoblamiento que ocurren durante el procesamiento de este pre-RNAr están indicados por los números en círculos. El desdoblamiento del transcrito primario en el sitio 1 elimina la secuencia terminal principal 5' y produce un intermediario 41S. El segundo desdoblamiento puede ocurrir en el sitio 2 o en el 3, según el tipo de célula. El desdoblamiento en el sitio 3 genera un intermediario 32S observado en las curvas de la figura previa. Los pasos finales del procesamiento implican la separación de las secciones 28S y 5.8S entre sí. (Según R.P. Perry, J. Cell Biol. 91:29s, 1981; con permiso de Rockefeller University Press.)



simple y carece de un componente membranoso, por lo que es uno de los organelos celulares mejor comprendidos. La parte central fibrilar del nucléolo (fig. 11-10) consiste en transcritos de DNAr y RNAr nacientes. Los gránulos que rodean este centro constan de subunidades ribosómicas en varias etapas de maduración. Cuando se suministra a las células ^3H -uridina y se practica autorradiografía en diferentes momentos de la incubación (como se describió para las proteínas secretorias en la página 279), la radiactividad aparece primero en las regiones fibrilares, lo que indica que son los sitios de síntesis de RNA. Como sería de esperar, conforme el tiempo de incubación aumenta, la radiactividad se desplaza hacia afuera al interior de las regiones granulares.

Síntesis y procesamiento del RNAr 5S

El RNAr 5S, de 120 nucleótidos de largo aproximadamente, forma parte de la subunidad ribosómica grande. En los ribosomas de procariotes y eucariotes se encuentra una especie de RNA similar. En células eucariotas, los genes RNAr 5S están totalmente separados de los genes que codifican los otros RNAr y se localizan fuera del nucléolo. Estos genes se organizan en fila con las posiciones transcritas, alternando con espaciadores no transcritos para formar unidades repetidas (fig. 11-15) análogas a las unidades repetidas que codifican los RNAr 18S y 28S. La RNA polimerasa III transcribe los genes RNAr 5S. El extremo 5' del transcrito primario es idéntico al del RNAr 5S maduro, pero el extremo 3' de ordinario contiene nucleótidos extra que son eliminados durante el procesamiento. Luego de su síntesis, el RNAr 5S se transporta al nucléolo para unirse a los otros componentes que participan en el ensamblado de subunidades ribosómicas.

De las tres polimerasas, la RNA polimerasa III raras veces se enlaza a un sitio promotor localizado dentro de la porción transcrita del gen en vez de un sitio hacia arriba en el flanco 5' del gen, que sería el sitio "lógico" donde la enzima se enlaza inicialmente al DNA. El uso de un promotor interno se demostró claramente introduciendo genes

RNAr 5S modificados en la célula huésped y determinando la capacidad del DNA para servir como plantilla de la polimerasa III del huésped. Se observó que podía eliminarse toda la región del flanco 5' y que la polimerasa todavía transcribía el DNA iniciador en el sitio normal de inicio. Sin embargo, cuando la supresión incluye la parte central del gen (desde el nucleótido 50 al 80 de los casi 120 pares de bases del gen), la polimerasa no transcribe el DNA y ni siquiera se enlaza al mismo. Si el promotor interno del gen RNAr 5S se introduce en otra región del genoma, el nuevo sitio se convierte en plantilla para la transcripción de la RNA polimerasa III.

Se requieren tres factores distintos de transcripción antes que la RNA polimerasa III inicie la transcripción de un gen codificador de RNAr 5S. Uno de los factores (TFIIIA) es específico para iniciar la transcripción de RNA 5S, en tanto que los otros dos factores (TFIIB y TFIIC) son necesarios para iniciar la transcripción de todos los RNA sintetizados por la RNA polimerasa III.

RNA de transferencia

Se estima que las células eucariotas tienen aproximadamente 60 especies diferentes de RNA de transferencia, cada una

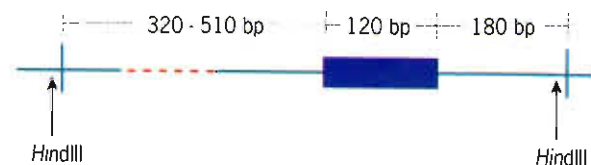


FIGURA 11-15. Unidad repetida del DNA que contiene el gen RNAr 5S en *Xenopus*. El gen que codifica el RNAr 5S se muestra en azul. El fragmento de DNA mostrado en esta figura se generó por tratamiento del DNA genómico (DNA extraído de los cromosomas) con la enzima de restricción HindIII. La porción roja representa un sitio en el cual pueden existir algunas secuencias pequeñas repetidas.

codificada por una secuencia de DNA repetida varias veces dentro del genoma. El grado de repetición varía con el organismo; se estima que las células de una levadura tienen casi 300 genes de RNAt en *total*, la mosca de la fruta casi 850 y el hombre cerca de 1 300. El RNA de transferencia se sintetiza a partir de genes localizados dentro de pequeños grupos dispersos alrededor del genoma. Un solo grupo típicamente contiene múltiples copias de *diferentes* genes de RNAt, e inversamente, la secuencia de DNA que codifica un RNAt de ordinario se encuentran en más de un grupo. Dentro de un grupo, el DNA (DNAt) consta principalmente de secuencias espaciadoras no transcritas junto con el RNAt que codifica las secuencias situadas a intervalos irregulares en disposición en serie repetida (fig. 11-16).

La RNA polimerasa III transcribe los RNAt, igual que el RNAr 5S, y la secuencia promotora del gen se sitúa dentro de la sección codificante de éste en vez de localizarse en su flanco 5'. El transcrito primario de una molécula de RNA de transferencia es mayor que el producto final y deben seccionarse los fragmentos sobre ambos extremos 5' y 3' del RNAt precursor (y un fragmento interior en algunos casos). Todo RNAt maduro posee un tripleto con secuencia CCA en su extremo 3'. Luego de procesar el RNAt, los tres nucleótidos se añaden por medio de enzimas.

RNA mensajero

Las moléculas de RNA de una célula constan de RNAr, RNAt y RNAsn. Pero cuando se incuban células eucariotas durante breve tiempo (cinco minutos) en ^3H -uridina o ^{32}P -fosfato, la cantidad de radiactividad incorporada a estos RNA particulares o sus precursores es relativamente escasa (fig. 11-17, a). Casi toda la radiactividad se incorpora a un grupo mayor de moléculas de RNA que muestran las siguientes propiedades. 1) Peso molecular elevado (más de 80S o 50 000 nucleótidos); 2) en conjunto, corresponden a RNA con diversas secuencias de nucleótidos (heterogéneos); y 3) sólo se encuentran en el núcleo. Debido a estas propiedades, este RNA se conoce como **RNA nuclear heterogéneo (RNA_{nh})**. Cuando se colocan células incubadas en ^3H -uridina o ^{32}P -fosfato durante un breve lapso (pulso) en un medio sin elementos marcados y se les "sigue" durante una hora aproximadamente antes de destruirlas y extraer su RNA, la radiactividad desciende bruscamente en los RNA nucleares grandes y aparece en los RNA citoplásmicos más pequeños (fig. 11-17, b).

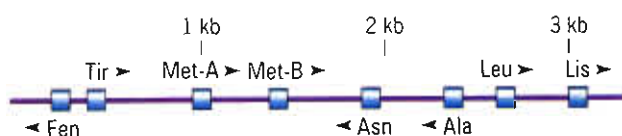


FIGURA 11-16. Disposición de los genes que codifican RNA de transferencia en *Xenopus*. Segmento de 3.18 kilobases de DNA genómico que muestra la disposición de varios genes de RNAt y de los espaciadores. (Según S.G. Clarkson y cols., en D.D. Brown, ed., *Developmental Biology Using Purified Genes*, Academic Press, 1981.)

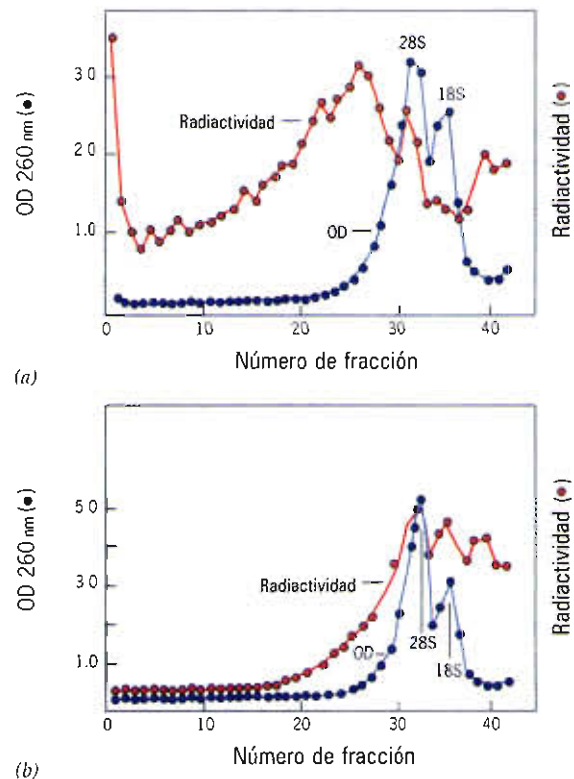


FIGURA 11-17. Formación de RNA nuclear heterogéneo (RNA_{nh}) y su conversión a RNAm más pequeño. a) Curvas que muestran el patrón de sedimentación del RNA total extraído de las células sanguíneas de patos luego de exponerlo a fosfato marcado con ^{32}P durante 30 minutos. El RNA más grande es el que se desliza mayor distancia durante la centrifugación y se deposita lo más cercano al fondo del tubo. La absorbancia (línea de color púrpura) indica la cantidad total de RNA en diferentes regiones del tubo de centrifugación, en tanto que la línea roja indica la radiactividad correspondiente. Es evidente que la mayor parte del RNA recién sintetizado es muy grande, mucho mayor que los RNAr 28S y 18S estables. Los RNA grandes son los RNA_{nh}. b) Perfiles de absorbancia y radiactividad del RNA extraído de células sometidas a un pulso de 30 minutos en un medio con radiactividad como en la parte a, luego seguido por tres horas en presencia de actinomicina D, que evita la síntesis de RNA adicional. Es evidente que el RNA_{nh} grande se ha procesado para formar productos RNA más pequeños. (Según G. Attardi, H. Parnes, M.-I. Huang y B. Attardi, *J. Mol. Biol.* 20:160, 1966.)

Cuando se efectuaron por primera vez estos experimentos en el decenio de 1960, se interpretaron como la demostración de una relación "precursor-producto" entre el RNA_{nh} del núcleo y los RNAm citoplásmicos. Según estos estudios, se propuso que el RNAm no se sintetiza como cuando se une a ribosomas citoplásmicos, sino más bien como parte de moléculas mucho mayores de RNA_{nh}. Posteriormente esta interpretación fue confirmada por los resultados de muchos trabajos de investigación en los últimos 25 años. Por lo tanto, aunque el RNAm (y sus precursores RNA nucleares heterogéneos) sólo constituye un pequeño porcentaje del RNA total, en la mayor parte de las células eucariotas significa, en todo momento, un elevado porcentaje del RNA sintetizado en dichas células (fig. 11-17, a). El RNA_{nh} es sumamente

inestable (por su rápido procesamiento en el núcleo); el RNAm es relativamente inestable (debido a su descomposición en el citoplasma); los RNAr y RNAt son relativamente estables, y por lo tanto se acumulan gradualmente y así llegan a ser la especie predominante dentro de la célula.

Mecanismo utilizado para la transcripción de RNAm

La RNA polimerasa II sintetiza a todos los RNAm precursores con ayuda de algunas proteínas auxiliares denominadas **factores generales de transcripción**, cuyo papel preciso aún no se define. Estas proteínas se conocen como factores "generales" de transcripción porque son las mismas requeridas por la polimerasa para la transcripción de diversos arreglos de genes. El promotor de la polimerasa II se sitúa en el lado 5' de la unidad de transcripción. En la mayor parte de los genes estudiados, la porción más crítica del promotor (denominada *elemento promotor central*) se sitúa entre las bases 24 y 32 hacia arriba a partir del sitio en el cual se inicia la transcripción (fig. 11-18, a). Esta región contiene una secuencia de bases idéntica a otra del oligonucleótido 5'-TATAAA-3', también conocida como *compartimiento TATA*. El compartimiento TATA del DNA es el sitio donde se ensambla un **complejo preinicial** que contiene los factores generales de transcripción y la polimerasa. El complejo preinicial debe ensamblarse antes de comenzar la transcripción del gen.

El primer paso en el ensamblado del complejo preinicial es la unión de una proteína, denominada *proteína de enlace TATA (PET)*, que reconoce específicamente la secuencia de DNA de los promotores eucariotas. El dominio de enlace a DNA de la PET se compone de una lámina β de 10 cadenas (pág. 56), incurvada para formar una estructura en forma de silla de montar donde cabalga el DNA (fig. 11-18, b). La PET no actúa por sí misma, más bien sirve como subunidad para algunos factores de transcripción de múltiples proteínas. Cuando forma parte del complejo multiproteína TFIID (factor de transcripción de la polimerasa II de la proteína D), la PET reconoce específicamente la secuencia de DNA de un promotor polimerasa II. La cristalografía de rayos X ha revelado que el enlace de la PET a un promotor polimerasa II causa deformación espectacular de la conformación del DNA (fig. 11-18, c). El DNA enlazado genera un claro retorcimiento en toda su longitud, y el doblete de DNA se desenrolla en un tramo de ocho pares de bases. Es probable que este cambio de conformación del DNA desempeñe un papel importante para el subsecuente inicio de la transcripción, que requiere una separación de la doble cadena de DNA para permitir la entrada de la polimerasa a la cadena que actúa como plantilla.

Por lo tanto, el primer paso en la síntesis de un complejo preinicial para polimerasa II es la unión de TFIID al promotor de DNA. El enlace de TFIID prepara el escenario para la unión ordenada de otros factores de transcripción y de la polimerasa para formar el complejo preinicial completo. En la figura 11-19 se muestra un modelo para el enlace secuencial de estos diferentes factores. Una vez iniciada la transcripción, algunos de los factores generales (específicamente TFIIB y TFIID) quedan detrás del promotor y otros permanecen asociados a la polimerasa conforme avanza sobre la plantilla (fig. 11-20). En tanto la TFIID permanezca enlazada al promotor, las moléculas adicionales de RNA polime-

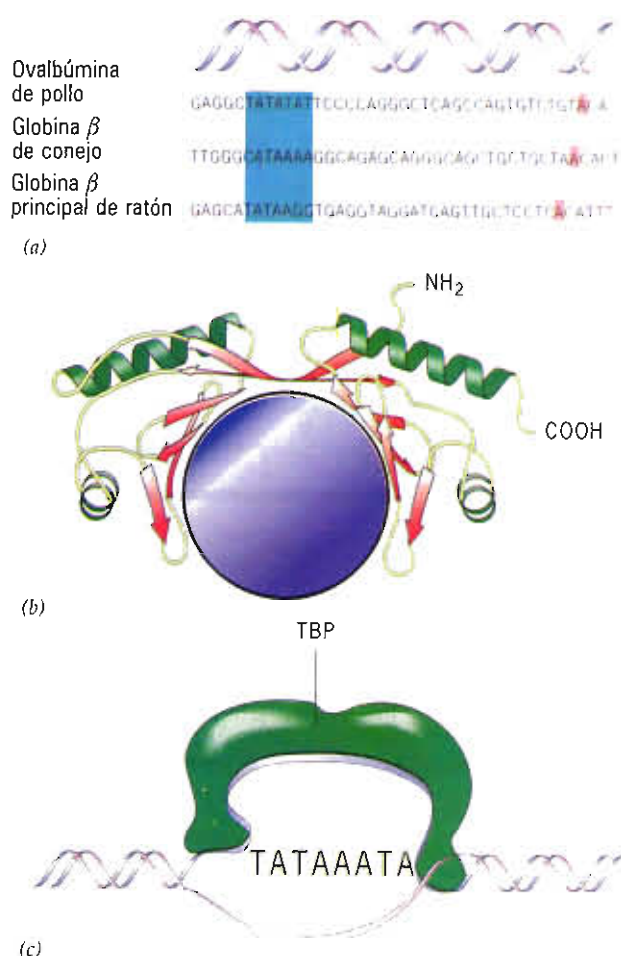


FIGURA 11-18. El segmento TATA en los promotores eucariotas.

a) Secuencia de nucleótidos de la región justo arriba del sitio donde se inicia la transcripción en tres genes eucariotas diferentes. El segmento TATA está indicado por el sombreado verde y el nucleótido en el cual se inicia la transcripción por el sombreado rojo. b) Estructura tridimensional de la proteína de unión a TATA (PUT) de la planta en floración *Arabidopsis thaliana* colocada a horcajadas sobre el DNA. c) El enlace de PUT se acompaña de notable distorsión en la conformación de la hélice de DNA que desenrolla un tramo de ocho pares de bases. (b: Según S. Burley y cols. Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol. 58:124, 1993; c: reimpresso con permiso de K. Struhl, Science 263:1104, 1994. Copyright 1994 por American Association for the Advancement of Science.)

rasa pueden fijarse al sitio promotor e iniciar sin retraso vueltas adicionales de transcripción.

El dominio C terminal (DCT) de la subunidad más grande de RNA polimerasa II tiene una estructura poco habitual; consta de una secuencia de siete aminoácidos (-Tir-Ser-Pro-Tre-Ser-Pro-Ser-) repetida una y otra vez. En mamíferos, el DCT consta de 52 unidades repetidas de este heptapéptido. De los siete aminoácidos, todos menos las dos prolínas son candidatos primarios para fosforilación mediante proteincinasas. Los estudios indican que la RNA polimerasa que ensambla el complejo preinicial no está fosforilada, en tanto que la misma enzima que participa en la transcripción está intensamente fosforilada; todos los gru-

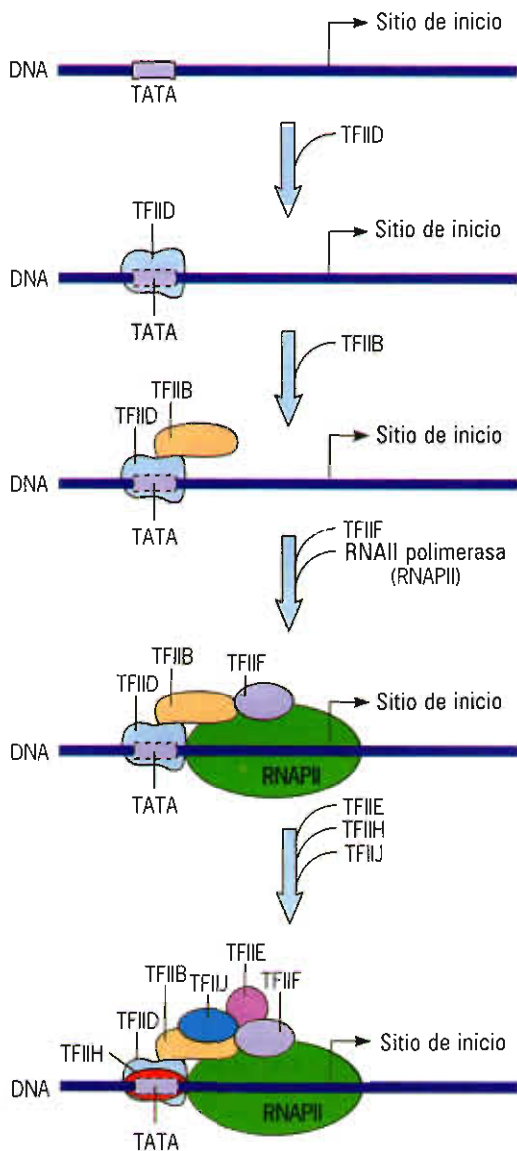


FIGURA 11-19. Etapas propuestas en el ensamblado del complejo de inicio para la RNA polimerasa II en el segmento TATA de un promotor eucariota. La polimerasa en sí se denota con RNAPII; los otros componentes son los diferentes factores generales de transcripción requeridos en el ensamblado de todo el complejo. (Según B.M. Herschbach y A.D. Johnson, reproducido con permiso de *Annual Review of Cell Biology*, vol. 9, © 1993, por Annual Reviews Inc.)

pos fosfato se localizan en el DCT (fig. 11-20). Pareciera que la RNA polimerasa II se fosforilara justo antes de iniciar la transcripción. Los datos indican que la fosforilación de la polimerasa es catalizada por una subunidad de uno de los factores de transcripción (TFIIH) que actúa como proteína-quinasa. La fosforilación de la polimerasa puede actuar como desencadenante para separar la enzima de los factores de transcripción que permanecen enlazados al compartimiento TATA y permitir que la enzima se desplace sobre la plantilla de DNA. Se cree que una de las otras subunidades de TFIIH desempeña un papel clave en la separación de las

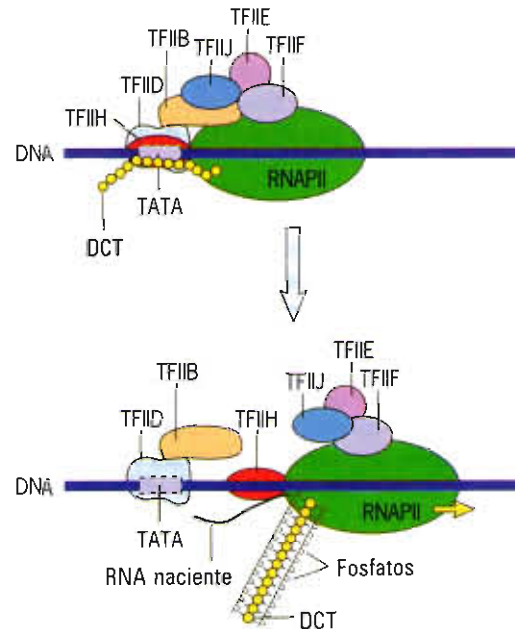


FIGURA 11-20. Inicio de la transcripción por la RNA polimerasa II precedida por fosforilación del dominio terminal C (DCT). Se cree que la fosforilación de la polimerasa provoca la separación del complejo de transcripción de los factores generales de transcripción que permanecen en el segmento TATA.

cadenas de DNA del doblete para que la polimerasa prosiga a lo largo de la cadena sencilla de la plantilla.

De igual manera que el segmento Pribnow de los procariotes, al cual se parece, el segmento TATA determina el sitio preciso donde se inicia la transcripción. Si se alteran o borran partes del segmento y luego se ensayan como plantillas en diferentes tipos de sistemas de prueba, la transcripción se inicia en varios sitios anormales. Otros muchos sitios del gen localizados hacia arriba desempeñan un papel clave para determinar a qué *velocidad* inicia la enzima nuevos turnos de transcripción a partir del segmento TATA. El papel de estos sitios se analiza en el capítulo acerca del control de la expresión de genes (sección 12-3).

Estructura de los RNAm

Todos los RNA mensajeros comparten ciertas propiedades: contienen una secuencia continua de nucleótidos que codifica un polipéptido específico; se encuentran en el citoplasma y están fijos a ribosomas o tienen capacidad para unirse a ellos para ser traducidos. La mayor parte de los RNAm contienen un segmento significativo no codificante, o sea, una porción que no controla el ensamblado de aminoácidos. Por ejemplo, casi 25% de cada RNAm de globina consta de regiones no codificantes, no traducidas (fig. 11-21). Las porciones no codificantes se observan en los extremos 5' y 3' de un RNA mensajero y contienen secuencias con un papel regulador importante (sección 12-3). Además de nucleótidos no codificantes, los RNAm eucariotas presentan modificaciones especiales en sus extremos terminales 5' y 3' no observadas en los mensajeros procariotas. El extremo 5' de

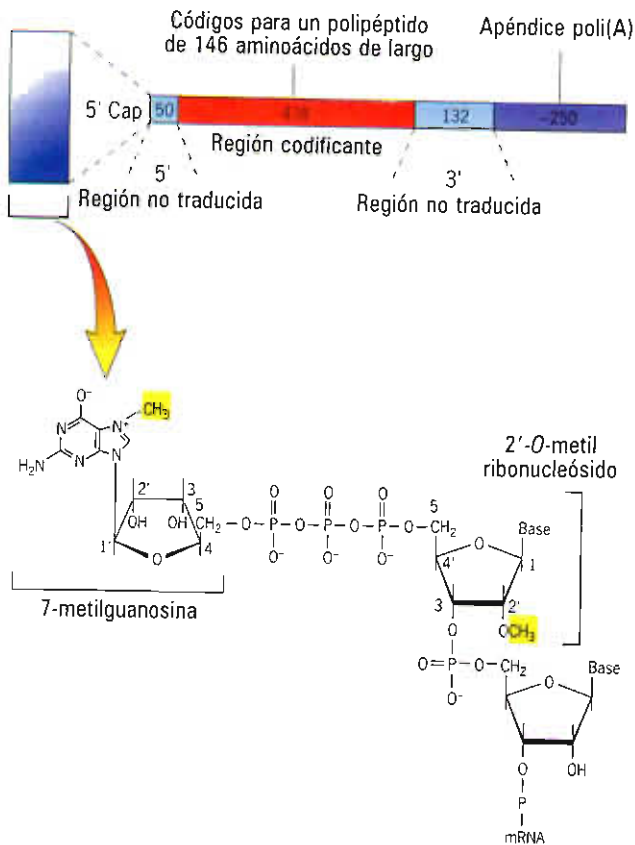


FIGURA 11-21. Estructura del RNAm de la globina β humana. EL RNAm contiene un casquete de metilguanósina 5', regiones no codificantes 5' y 3' que flanquean el segmento codificante, y un apéndice poli(A). La longitud de cada segmento se marca como número de nucleótidos. La longitud del apéndice poli(A) es variable. Típicamente comienza a una longitud de casi 250 nucleótidos y poco a poco se reduce en longitud, como se analiza en el capítulo 12. Se muestra la estructura del casquete 5'.

un RNAm eucariota tiene un “casquete” de guanosina metilada, en tanto que el extremo 3' tiene una cadena de 50 a 250 residuos de adenosina que forman un apéndice poli(A) (fig. 11-21). En breve describiremos cómo adquieren los RNAm sus característicos extremos terminales especializados 5' y 3'. Sin embargo, primero es necesario invertir un poco de tiempo para entender cómo se forman los RNAm en la célula.

Desdoblamiento de genes: un hallazgo inesperado

Casi en seguida del descubrimiento de los RNAnh se propuso que ese grupo de RNA nuclear que con rapidez capta el material marcado era precursor de los RNAm citoplásmicos (pág. 449). Conforme se adquirió mayor conocimiento acerca de los RNAnh durante los decenios de 1960 y 1970, se estableció con mayor firmeza una relación precursor-producto entre el RNAnh y el RNAm. Por ejemplo, se demostró que el RNAnh, igual que los RNAm, contiene un casquete 5' de metilguanosina y un apéndice poli(A) 3' y, todavía de mayor importancia, que la secuencia específica

de RNAm estaba presente en la población de RNAnh. El principal punto de controversia fue la diferencia de tamaño de los RNA de ambas poblaciones: los RNAnh son varias veces más grandes que los RNAm (fig. 11-22). ¿Por qué las células sintetizan moléculas enormes como precursores de versiones mucho más pequeñas?

Los primeros estudios del procesamiento de RNA ribosómico demostraron que podía formarse RNA maduro a partir de precursores de mayor tamaño. Recordemos que durante el procesamiento de los RNAr (fig. 11-14) se eliminan los segmentos grandes de los lados 5' y 3' de diferentes intermediarios para producir los RNA finales maduros. Se pensó que una vía similar pudiera explicar el procesamiento de RNAnh para formar RNAm. Infortunadamente, los RNAm constituyen una población tan diversa que casi es imposible seguir los pasos del procesamiento de una sola especie de RNAm como se ha hecho para los RNAr. El problema se resolvió gracias a una inesperada secuencia de acontecimientos.

Aun en 1977, los biólogos moleculares asumían que una secuencia lineal continua de nucleótidos del RNA mensajero es complementaria de una secuencia continua de nucleótidos que compone la cadena de DNA de un gen. Por entonces, Philip Sharp y sus colegas del MIT, y Richard Roberts y colaboradores, de Cold Spring Harbor Laboratories de Nueva York, hicieron un notable descubrimiento. Ambos grupos de investigadores observaron que las moléculas de RNA se transcriben a partir de segmentos discontinuos de DNA, segmentos que estaban separados entre sí a lo largo de la cadena de la plantilla de DNA.

Las observaciones iniciales más importantes se hicieron durante el análisis de la transcripción del genoma de un adenovirus. El adenovirus es un patógeno capaz de infectar gran variedad de células de mamífero. Se observó que algunos de los diferentes RNA mensajeros del adenovirus se componen de los mismos 150 a 200 nucleótidos terminales. Podría esperarse que esta secuencia principal represente un tramo de nucleótidos repetidos localizados cerca de la región promotora de cada uno de los genes para estos RNAm. Sin embargo, un análisis más atento reveló que la secuencia principal 5' no es complementaria de una secuencia repetida y, más aún, ni siquiera es complementaria de un tramo continuo de nucleótidos en la plantilla de DNA. En vez de eso, la secuencia principal se transcribe a partir de tres segmentos de DNA distintos y separados (representados por los bloques x, y y z en la figura 11-23). Las regiones de DNA situadas entre estos bloques, conocidas como **secuencias interpuertas** (I_1 a I_3 en la figura 11-23), por alguna razón están ausentes en el RNAm correspondiente. Se podría argumentar que la presencia de secuencias interpuertas es una peculiaridad de genomas virales, pero esta observación básica pronto se amplió a los propios genes celulares.

Según se analizó en la página 418, las bacterias contienen enzimas de restricción que reconocen y desdoblán moléculas de DNA en el sitio de ciertas secuencias de nucleótidos. A mediados del decenio de 1970 se usó una gran variedad de dichas enzimas para analizar los sitios de desdoblamiento (*sitios de restricción*) bien estudiados presentes en algunos genes y alrededor de ellos. Alec Jeffreys y Richard Flavell, de la Universidad de Amsterdam, estudia-

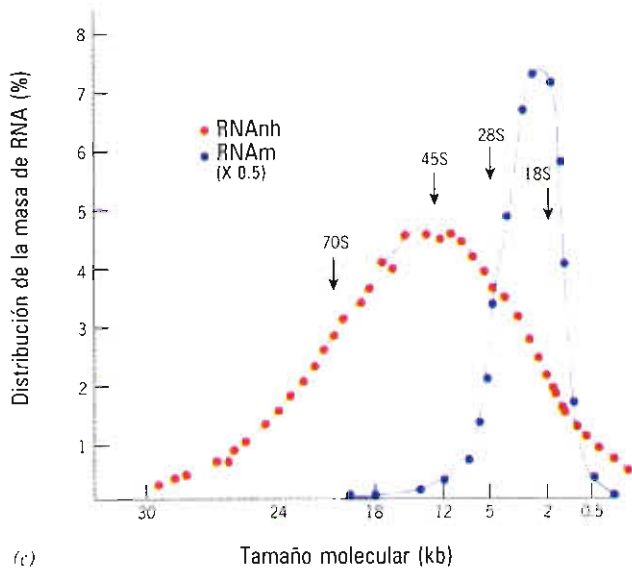
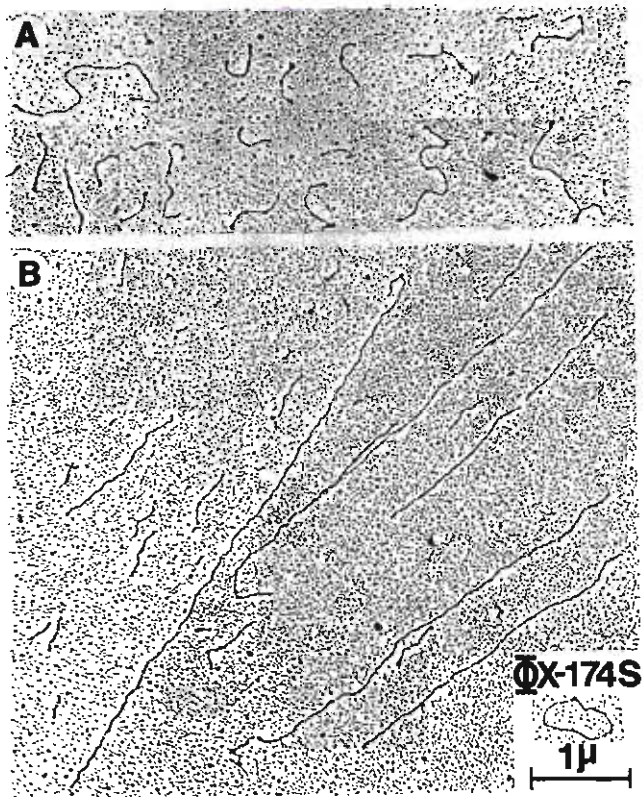


FIGURA 11-22. Diferencia de tamaño entre las poblaciones de RNAnh y RNAm. *a, b*) Micrografías electrónicas de preparaciones de moléculas poli(A)-RNAm (*a*) y poli(A)-RNAnh (*b*) con sombreado metálico. Se muestran los tamaños representativos de los diferentes tipos. La molécula de referencia es el DNA viral Φ X174. *c*) Distribución de los tamaños de RNAnh y RNAm de las células L de ratón según se determinan mediante sedimentación en gradiente de densidad. La línea roja representa el RNAnh que rápidamente muestra la marca, en tanto que la línea púrpura representa los RNAm aislados de los polirribosomas luego de cuatro horas del periodo de marcado. La abscisa se convirtió de números de fracción (indicado por los puntos) a tamaño molecular calibrando los gradientes. (Según John A. Bantle y W. E. Hahn, Cell 8:145, 1976; con permiso de Cell Press.)

ron el DNA de conejo que contenía el gen de globina β . Observaron que el DNA posee un sitio de restricción para la enzima *Bam*H1 (B en la figura 11-24) localizada aproximadamente a 700 pares de bases a partir del sitio de restricción para la enzima *Eco*R1 (E en la figura 11-24). En notable contraste, cuando trataron una preparación de globina DNAC (un DNA complementario sintetizado a partir del RNAm purificado para globina β por la enzima transcriptasa inversa, sección 17-12) con estas mismas enzimas, los sitios correspondientes B y E se localizaron a una distancia de 67 nucleótidos (línea de abajo en la figura 11-24). Al parecer, el gen globina contiene una secuencia interpuesta de casi 600 pares de bases localizada directamente dentro de una porción del gen que codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido globina. Un análisis posterior indicó que este inserto no codificante estaba presente en el DNA extraído de varios tejidos del conejo, incluyendo espermatozoides, y por lo tanto no tiene relación con la expresión del gen. Más tarde, la determinación de la secuencia completa del gen de globina β demostró que contiene una segunda secuencia interpuesta más pequeña no descubierta en los estudios iniciales.

Los conocimientos acerca de la estructura del gen logrados con el gen de globina pronto se extendieron a otros genes, y se demostró que la presencia de genes con secuencias interpuestas, llamados **genes cortados**, es más la regla que la excepción. Las partes de un gen cortado que contribuyen a un producto RNA maduro se denominan **exones**, en tanto que las partes que corresponden a las secuencias interpuestas se denominan **intrones**. Los genes cortados son más abundantes en los eucariotes, tanto en eucariotes más simples como en levaduras y protozoarios, y en los reinos animal y vegetal. (Sin embargo, los intrones de los eucariotes inferiores tienden a ser más escasos y de menor tamaño que los de plantas y animales.) Se observan en todo tipo de gen, incluyendo RNAt, RNAr, RNA viral y genes que codifican proteínas celulares. No obstante, la mayor parte de los genes que codifican RNAt y RNAr no son genes cortados y algunas proteínas (incluyendo histonas, interferón y ciertos polipéptidos virales) también son codificadas por secuencias de DNA continuas.

El descubrimiento de los genes con secuencias interpuestas planteó de inmediato la pregunta de cómo dichos genes pueden producir RNA mensajero que carezca de esas secuencias. Una posibilidad era que las células produjeran un transcrito primario que correspondiera a toda la unidad de transcripción y que las porciones de RNA correspondientes a las secuencias de intervención del DNA de alguna manera fueran eliminadas. Si este era el caso, entonces en el transcrito primario debían estar presentes los segmentos correspondientes a los intrones. Esta explicación también debiera suministrar una razón acerca del tamaño mucho mayor de las moléculas de RNAnh, en comparación con las moléculas de RNAm que finalmente producen.

La investigación acerca del RNA nuclear ha proseguido en estos últimos años hasta el punto que se han determinado las dimensiones de unos pocos precursores de RNAm (pre-RNAm). Por ejemplo, se observó que la secuencia de globina está presente en una molécula de RNA nuclear que sedimenta a 15S, a diferencia del RNAm de globina final cuyo coefi-

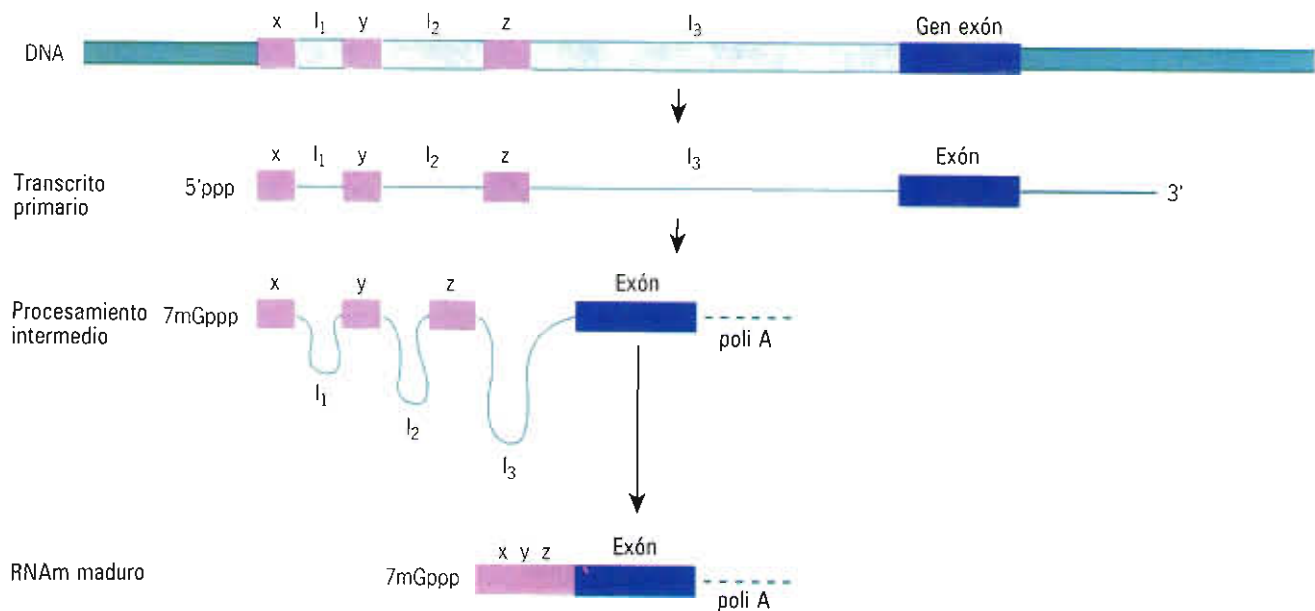


FIGURA 11-23. Descubrimiento de las secuencias interpuestas. En la parte de arriba se muestra el genoma de un adenovirus. Los bloques de la secuencia discontinua marcados x, y y z aparecen en disposición continua en el RNA que codifica varios polipéptidos, como la proteína exón. Según se analiza más adelante en el texto, la conversión del precursor a RNA implica eliminar (excisión) las secuencias interpuestas (l₁-l₃) y ligar las porciones restantes para producir una molécula de RNA continua (abajo). En la figura 11-36 se muestran los pasos del proceso.

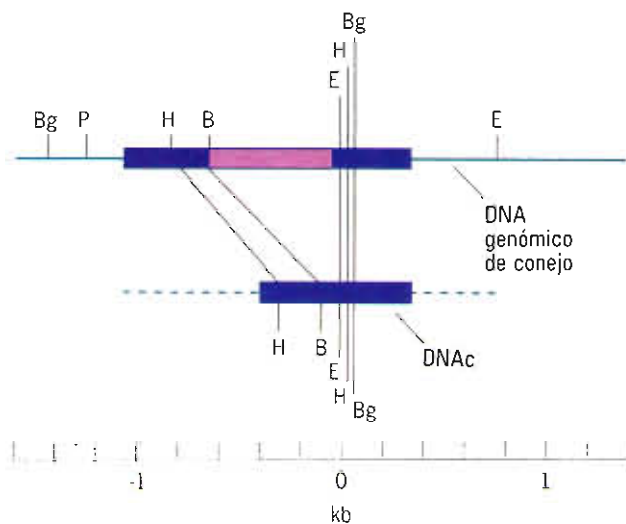
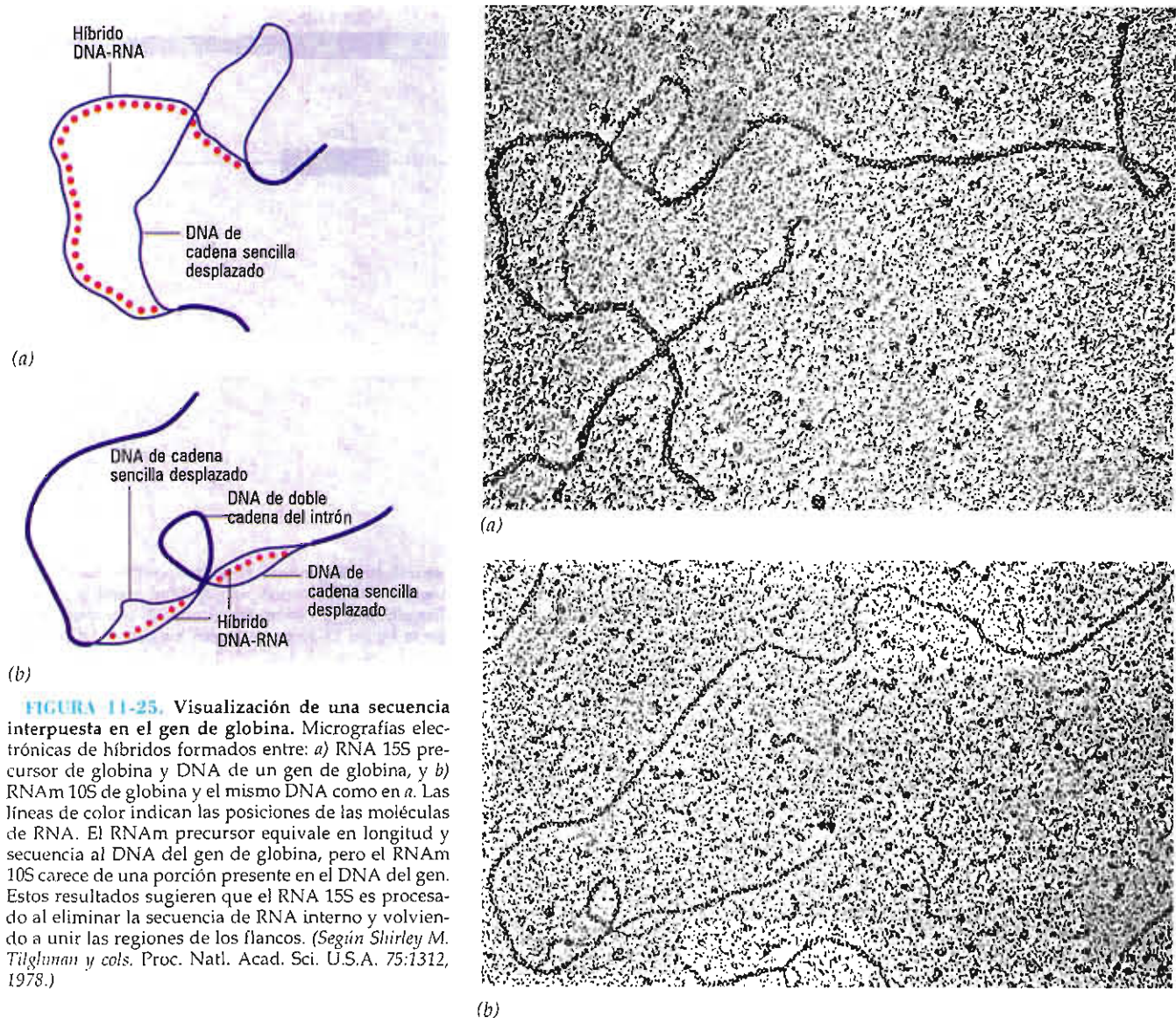


FIGURA 11-24. Descubrimiento de las secuencias interpuestas en un gen eucariota. Mapa de los sitios de desdoblamiento por enzimas de restricción en la región del gen de globina β de conejo (arriba) y el correspondiente mapa de DNAC preparado del RNA de globina β (abajo). (Un DNAC es un DNA formado *in vitro* por la transcriptasa inversa utilizando RNA como plantilla. Por lo tanto, el DNAC posee la secuencia complementaria al RNA.) Las letras indican los sitios donde las diferentes enzimas de restricción separan al DNA. Según los sitios donde las enzimas rompen a los dos DNA, es evidente que el DNA preparado a partir del genoma tiene una región cuantificable ausente del correspondiente DNAC (y por lo tanto ausente del RNA a partir del cual se produjo el DNAC). (Según A.J. Jeffreys y R.A. Flavell, *Cell* 12:1103, 1977; con permiso de Cell Press.)

cienta de sedimentación es de 10S. Shirley Tilghman, Philip Leder y sus colaboradores, de los National Institute of Health en Estados Unidos, emplearon una ingeniosa técnica (conocida como formación de una asa R) para determinar la relación física entre los RNA de globina 15S y 10S y obtener información acerca de la transcripción de genes cortados.

Recordemos de la página 402, que las cadenas simples de DNA complementario pueden enlazarse específicamente entre sí. También pueden enlazarse entre sí el DNA de una sola cadena y las moléculas de RNA, siempre y cuando posean secuencias complementarias de nucleótidos; esta es la base de la técnica de hibridación de DNA-RNA analizada en la sección 17-12 (el complejo DNA-RNA se denomina *híbrido*). Tilghman y sus colaboradores observaron en el microscopio electrónico que cuando se formaba un híbrido entre un fragmento de DNA que contiene el gen de globina y el RNA 15S, las dos moléculas se enlazaban entre sí para formar un híbrido de DNA-RNA de doble cadena continua (fig. 11-25, a). En contraste, cuando se incubaba el mismo fragmento de DNA con RNA de globina 10S maduro, emergía un gran segmento de DNA en el centro de la región codificante para formar una asa de doble cadena (fig. 11-25, b). Esta asa se formaba como resultado de la interposición en el DNA de una gran secuencia no complementaria de cualquier parte del mensaje globina más pequeño. Al parecer, el RNA 15S en realidad contiene segmentos correspondientes a secuencias interpuestas en los genes que son eliminadas durante la formación del RNA 10S.

Más o menos al mismo tiempo se efectuó un experimento de hibridación de tipo similar entre el DNA que co-



difica la ovalbúmina, una proteína que se encuentra en los huevos de gallina, y su correspondiente RNAm. El híbrido formado entre el DNA y el RNAm de la ovalbúmina contiene 7 asas distintas que corresponden a 7 secuencias interpuertas (fig. 11-26). Consideradas en conjunto, las secuencias interpuertas equivalen a casi tres veces más el DNA que las ocho porciones codificadas combinadas (exones). Estudios subsecuentes han revelado que los intrones de un gen promedian 4 a 10 veces la longitud de los exones, y por esta razón las moléculas del RNAm en condiciones típicas son mucho más largas que las de RNAm. Un gen de ratón se extiende más de 20 veces que el DNA necesario para codificar sus correspondientes mensajes, y el gen para colágena tipo I contiene más de 50 secuencias interpuertas.

Estos y otros datos suministraron fuertes pruebas para proponer que la formación del RNAm ocurre por supresión

de la secuencia interna de ribonucleótidos a partir de un pre-RNAm mucho más grande. Volvamos a los pasos por los cuales ocurre esto.

Procesamiento del RNA mensajero

La RNA polimerasa II ensambla un transcrito primario complementario del DNA de toda la unidad de transcripción. A continuación este transcrito se procesa en el núcleo para formar RNAm maduro que se transporta al citoplasma. El examen de genes transcriptores activos en el microscopio electrónico indica que los transcritos de RNA se asocian a diferentes proteínas huéspedes y a numerosas partículas distintas, mientras aún se encuentran en proceso de síntesis (fig. 11-27). Estas partículas constan de proteínas y ribonucleoproteínas, e incluyen los agentes encargados de convertir el transcrito primario en el mensajero maduro. Los pri-

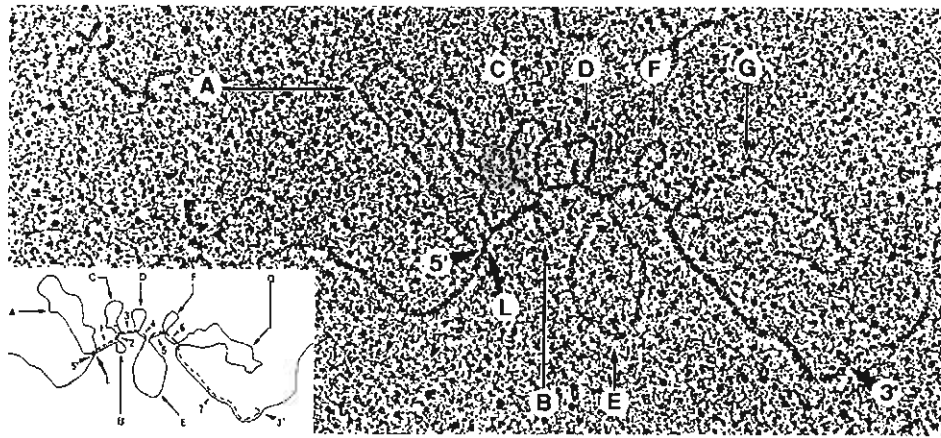


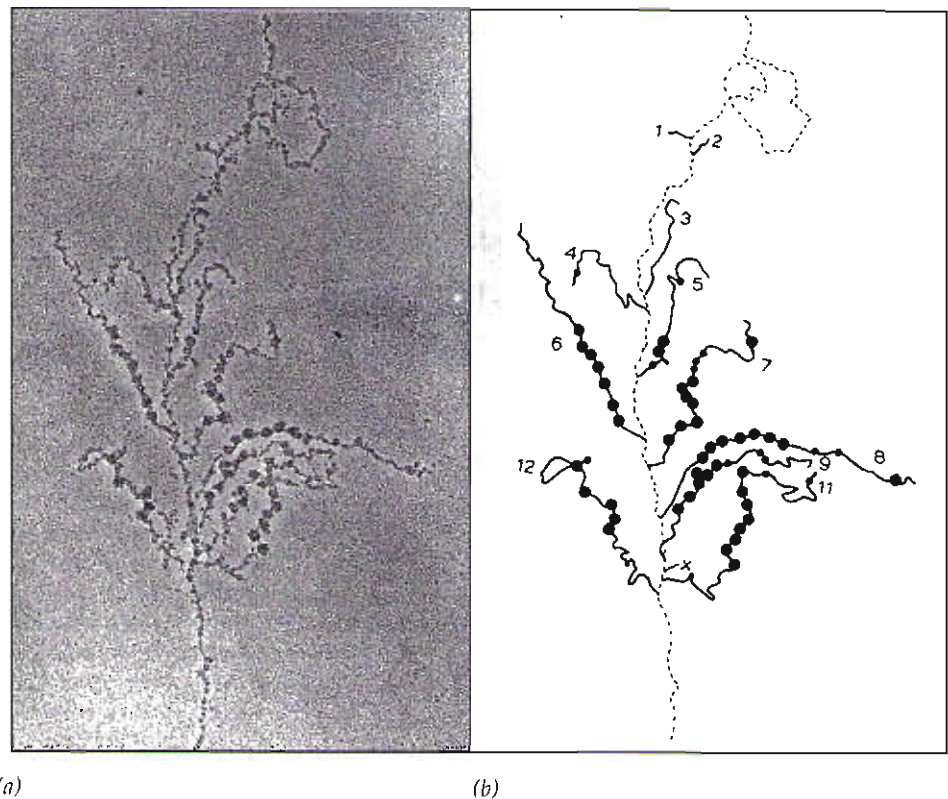
FIGURA 11-26. Secuencias interpuestas en el gen de ovalbúmina. Micrografía electrónica de un híbrido formado entre el RNAm de ovalbúmina y un fragmento de DNA genómico de pollo que contiene el gen de ovalbúmina. El híbrido mostrado en esta microfotografía es similar en naturaleza al de la figura 11-25, *b*. En ambos casos, el DNA contiene toda la secuencia del gen y por lo tanto se aisló directamente del genoma. En contraste, el RNA fue completamente procesado y las partes transcritas de las secuencias interpuestas fueron eliminadas. Cuando el DNA genómico y el RNAm se hibridizan, las porciones de DNA no representadas en el RNAm forman asas. Se pueden observar la asas de las siete secuencias interpuestas (A-G). (Cortesía de Pierre Chambon.)

meros pasos de este proceso de conversión incluyen la adición de un casquete 5' y el apéndice poli(A) 3'.

Casquete 5' y apéndice poli(A). El extremo 5' de todos los RNAm posee inicialmente un trifosfato derivado del primer trifosfato de nucleósido incorporado en el sitio

donde se inicia la síntesis de RNA. Una vez que se forma el extremo 5' de un precursor RNAm mediante la acción de la RNA polimerasa II, varias enzimas actúan para modificar ese extremo de la molécula (fig. 11-28). En el primer paso, se elimina el último de los tres fosfatos convirtiendo el extremo

FIGURA 11-27. Asociación de proteínas con las moléculas pre-RNAm nacientes para formar fibrillas de ribonucleoproteínas. *a*) Micrografía electrónica de una unidad de transcripción no ribosómica. *b*) Trazo para interpretar la micrografía mostrada en la parte *a*. La línea punteada representa la cadena de cromatina, la línea sólida representa fibrillas de ribonucleoproteína (RNP) y los círculos sólidos representan partículas de RNP relacionadas con las fibrillas. Las partículas de RNP no se distribuyen al azar a lo largo del transcrito nascente, sino más bien se enlazan a sitios específicos donde tiene lugar el procesamiento de RNA. (Según Ann L. Beyer, Oscar L. Miller, Jr. y Steven L. McKnight, *Cell* 20:78, 1980; con permiso de Cell Press.)



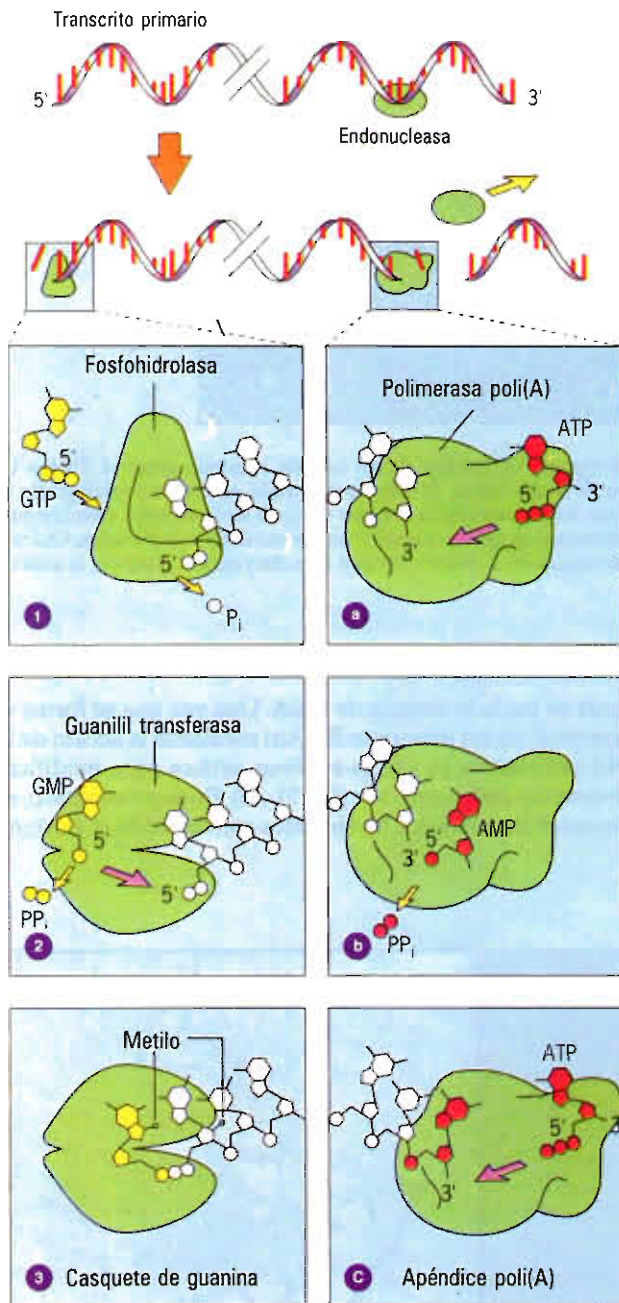


FIGURA 11-28. Etapas en la adición de un casquete de metilguanina 5' y un apéndice poli(A) 3' a un pre-RNm. El extremo 5' del pre-RNm fosfato terminal se enlaza a una fosfohidrolasa (paso 1) que elimina el grupo fosfato terminal. En el paso 2, una guanilil transferasa añade un residuo de guanina en orientación inversa mediante una unión de 5' a 5'. En el paso 3, a los grupos metilo se les añade tanto el casquete de guanina terminal como el nucleótido situado en el extremo del RNA naciente. En el extremo 3' del pre-RNm ocurre una serie muy diferente de acontecimientos. Primero, una endonucleasa reconoce una secuencia específica (UAAUUU) y desdobra la cadena de RNA, generando un nuevo extremo 3'. En los pasos a-c, la polimerasa poli(A) añade residuos de adenosina al extremo 3'. Un RNAm típico de mamífero contiene de 200 a 250 residuos de adenosina en su apéndice poli(A); este número es considerablemente menor en eucariotes inferiores. (Según D.A. Micklos y G.A. Freyer, DNA Science, Carolina Biological Supply Co.)

terminal 5' en difosfato (paso 1, fig. 11-28). A continuación se añade un GMP en orientación *invertida*, de modo que el extremo 5' de la guanosina quede frente al extremo 5' de la cadena de RNA (paso 2, fig. 11-28). Como resultado, los dos últimos nucleósidos se encuentran unidos por un puente 5'-5' trifosfato. Por último, el extremo terminal "invertido" de guanosina se metila en la posición 7 sobre su base de guanina, en tanto que el nucleótido del lado interno del puente de trifosfato se metila en la posición 2' de la ribosa (paso 3, fig. 11-28). El extremo 5' del RNA ahora contiene un **casquete de metilguanina** (como se muestra con mayor detalle en la figura 11-21). Estas modificaciones enzimáticas en el extremo 5' del transcrito primario ocurren con gran rapidez, mientras la molécula de RNA todavía se encuentra en las etapas iniciales de síntesis. Además de la metilación de los nucleótidos terminales del precursor RNAm, varios residuos de nucleótidos internos también pueden ser metilados o no serlo. Se cree que el casquete de metilguanina del extremo 5' de un RNAm tiene varias funciones: evita que el extremo 5' del RNAm sea digerido por nucleasas, ayuda a transportar RNAm hacia afuera del núcleo y desempeña un papel importante para iniciar la traducción del RNAm.

Como se mencionó antes, el extremo 3' de un RNAm contiene una cadena de residuos de adenosina que forman un **apéndice poli(A)**. Este apéndice invariablemente se encuentra a unos 15 nucleótidos hacia abajo de una secuencia AAUAAA que sirve como sitio de reconocimiento para una nucleasa que desdobra el pre-RNm situado justamente hacia abajo de este sitio (fig. 11-28, lado derecho del RNA). Normalmente, una vez pasado este sitio la RNA polimerasa avanza bien sobre la plantilla de DNA hasta que concluye la transcripción. Luego del desdoblamiento por las nucleasas, una enzima llamada *polimerasa poli(A)* añade las adenosinas que componen el apéndice poli(A) (pasos a-c, fig. 11-28). Como se analiza en la sección 12-3, poli(A) participa en la estabilización del RNAm dentro del citoplasma protegiéndolo del desdoblamiento prematuro. Puesto que un porcentaje considerable del RNAm carece de apéndice poli(A) (incluyendo los que codifican histonas), la presencia de esta modificación no es requisito para la síntesis, procesamiento, transporte o traducción de un RNAm eucariota.

Empalme del transcrito primario: eliminación de las secuencias interpuestas. Las partes de un transcrito primario que corresponden a secuencias de DNA interpuestas (intrones) se eliminan mediante un proceso complejo conocido como **empalme del RNA**. Para empalmar un RNA, se debe introducir una pausa en la cadena a nivel de los bordes 5' y 3' (o **sitios de desdoblamiento**) de cada intrón, y los exones situados a ambos lados de los sitios de empalme deben unirse mediante enlaces covalentes (ligados). En la figura 11-29 se muestra todo el proceso de ensamblado del pre-RNm de globina. Es imperativo que el proceso de empalme ocurra con absoluta precisión, puesto que la presencia o ausencia de un solo nucleótido anormal en cualquiera de las uniones de empalme cambia el cuadro de lectura del mensaje y causa errores de traducción.

¿Cómo puede el mecanismo de empalme reconocer el límite entre un exón y un intrón? Inicialmente, esta pregunta se respondió mediante el análisis de la secuencia de DNA. El examen de cientos de uniones entre exones e intrones en

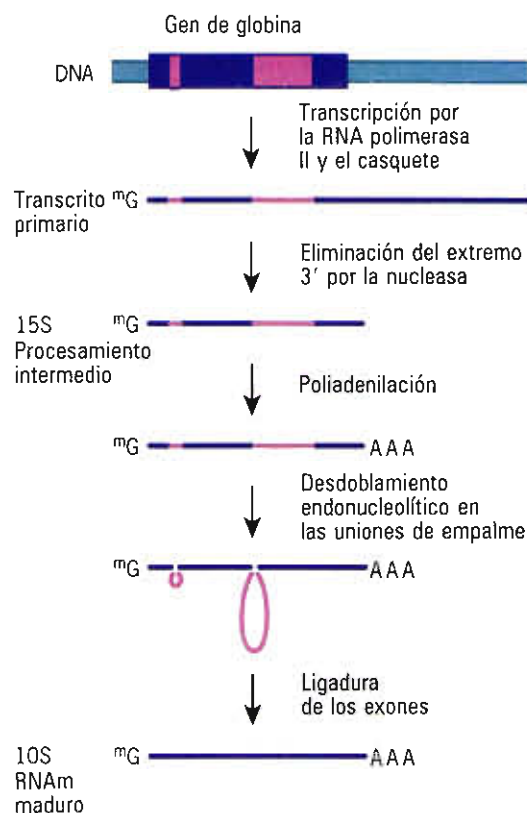


FIGURA 11-29. Esquema general de las etapas que ocurren durante el procesamiento del RNAm de globina. Las secuencias interpuestas se muestran en color rosa, en tanto que las porciones azul oscuro del gen indican las posiciones de los exones, o sea, las secuencias de DNA representadas en el RNA mensajero maduro.

eucariotes, desde levaduras e insectos hasta vertebrados, reveló la presencia en los sitios de empalme de una secuencia de nucleótidos altamente conservada de origen evolutivo ancestral. En notable contraste, las secuencias de la porción interna de los intrones tienden a ser muy divergentes. En la figura 11-30 se muestra la secuencia encontrada con mayor frecuencia en el límite exón-intrón dentro de las moléculas de RNAnh. La G/GU en el extremo 5' del intrón (*sitio de empalme 5'*) y la AG/G en el extremo 3' del intrón (*sitio de empalme 3'*) prácticamente aparecen en todos los pre-RNAm eucariotas. La sustitución de una sola base en la secuencia de DNA dentro de estos tramos invariables bloquea la excisión del intrón, lo que conduce a la acumu-

lación de precursores no empalmados. Esto ocurre en ciertos tipos de talasemias humanas, una deficiencia de globina caracterizada por anemia. En la mayor parte de los casos, los RNA no empalmados son reconocidos y desdoblados de modo que no se envían al citoplasma y se traducen a polipéptidos no funcionales.

En los últimos 10 años se elaboró una descripción para explicar muchos de los pasos implicados en el empalme de los transcritos pre-RNAm. Conforme las moléculas grandes de RNAnh se transcriben, cada intrón se asocia a un complejo macromolecular llamado **esplíceosoma**. El esplíceosoma contiene varias proteínas y algunas partículas de distintas ribonucleoproteínas denominadas **RNPnp** porque se componen de RNAnp enlazado a proteínas específicas (cuadro 11-1). El análisis de RNPnp recibió gran apoyo cuando se descubrió que la sangre de pacientes afectados de ciertas enfermedades autoinmunitarias (como lupus eritematoso generalizado, en el cual la persona produce anticuerpos contra sus propios componentes celulares) contenía anticuerpos que reaccionan con partículas pequeñas presentes en el núcleo celular (fig. 11-31). Usando antisero obtenido de estos pacientes, Joan Steitz y sus colegas, de la Universidad de Yale, pudieron purificar algunos RNPnp. Aislaron cuatro RNPnp diferentes: RNPnp U1, RNPnp U2, RNPnp U4/U6 y RNPnp U5. Algunas proteínas son peculiares de un RNPnp particular; otras son compartidas como una porción del núcleo central común.

Mecanismo de empalme de los pre-RNAm. El descubrimiento, en 1982, de que los precursores RNAr de los protozoarios ciliados *Tetrahymena* podían empalmarse por sí mismos (analizado en *La vía experimental*, al final del capítulo) cambió el concepto de los biólogos acerca del mecanismo de empalme del RNA. El intrón del pre-RNAr de *Tetrahymena* es un ejemplo de intrón del grupo I. Los intrones del grupo I se observan con mayor frecuencia en mitocondrias de hongos y plantas, cloroplastos de plantas y en el RNA nuclear de eucariotes evolutivamente inferiores, como *Tetrahymena*. Aunque la secuencia de nucleótidos de los intrones del grupo I puede ser muy variable, todos tienen capacidad para formar estructuras tridimensionales muy parecidas (fig. 11-32). Esta compleja estructura plegada, junto con varias placas bien situadas de nucleótidos conservados, permite a estos intrones desdoblarse por sí mismos. Posteriormente se descubrió otro tipo de intrón autoempalmable, denominado intrón *grupo II*, en las mitocondrias de hongos y cloroplastos de plantas. Los intrones del grupo II también se pliegan en una estructura muy compleja (fig. 11-33, a), pero muy diferente de los intrones del grupo I. A

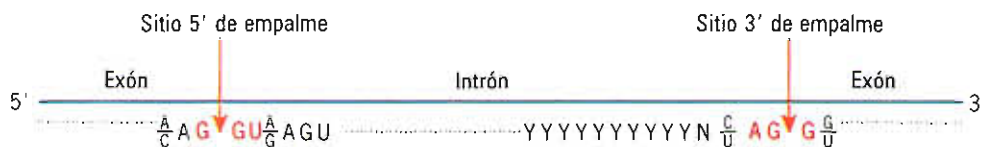


FIGURA 11-30. Secuencias de nucleótidos en los sitios de empalme de pre-RNAm. Las secuencias de nucleótidos mostradas en las regiones de los sitios de empalme se basan en el análisis de numerosos pre-RNAm. Las bases mostradas en amarillo prácticamente son invariables. Las que se muestran en negro representan la base preferida en dicha posición. N representa cualquier uno de los cuatro nucleótidos; Y es una pirimidina.

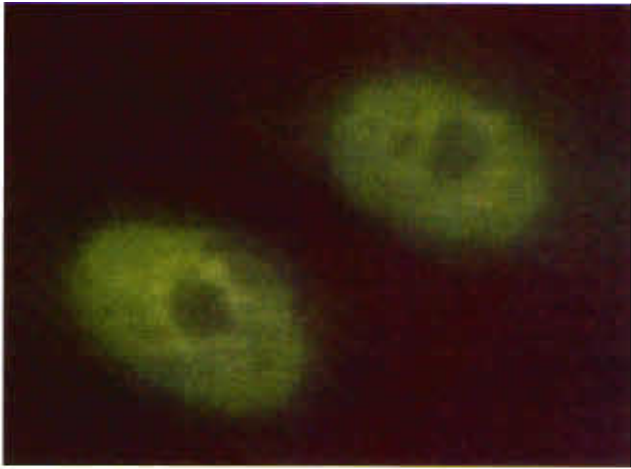


FIGURA 11-31. Localización mediante inmunofluorescencia de U1 RNP en los núcleos celulares mediante anticuerpos presentes en el suero de un paciente con enfermedad autoinmunitaria. El suero de diferentes pacientes contiene anticuerpos dirigidos contra distintos componentes nucleares. Las células cultivadas que aquí se muestran fueron tratadas con un anticuerpo fluorescente contra U1 RNP, que tiñe al núcleo, pero no al nucléolo ni al citoplasma. El antisuero, como el que aquí se emplea, ha mostrado utilidad para identificar y purificar los componentes del mecanismo de empalme. (Cortesía de Joan A. Steitz.)

diferencia de los intrones del grupo I, los intrones del grupo II se empalman por sí mismos pasando por una etapa intermedia denominada *lazada* (fig. 11-33, b), debido a que recuerda el tipo de lazo usado por los vaqueros para lazar becerros a la carrera.

Los pasos que ocurren durante la eliminación de intrones en moléculas pre-RNAm de células animales prácticamente son idénticos a los seguidos por los intrones del grupo II. La principal diferencia es que el pre-RNAm no se puede empalmar por sí mismo, sino que requiere múltiples RNAnp nucleares (fig. 11-34) y sus proteínas relacionadas (fig. 11-35). El hecho de que: 1) el pre-RNAm se empalme siguiendo la misma serie de reacciones químicas que ocurren en los intrones del grupo II cuando se autoempalman, y 2) el RNAnp requerido para el empalme del pre-RNAm se parezca mucho a porciones de los intrones del grupo II (fig. 11-34), sugiere fuertemente que el RNAsn es el componente catalíticamente activo de los RNAnp, y no las proteínas. Si esto es cierto, las proteínas ejercerían un papel complementario, por ejemplo, mantener la estructura tridimensional apropiada de los RNAnp para transportar a los RNAm empalmados a la envoltura nuclear y actuar como sitios de interacción con factores reguladores.

Nuestra comprensión del mecanismo de empalme del RNA se logró principalmente a través de estudios de extractos de células libres que pueden empalmar con precisión pre-RNAm *in vitro*. La secuencia de acontecimientos que supuestamente ocurren durante el empalme de un intrón de pre-RNAm se indican en la figura 11-36 y se describen con cierto detalle en el pie de la figura acompañante. Los sucesos descritos en la figura 11-36 suministran el ejem-

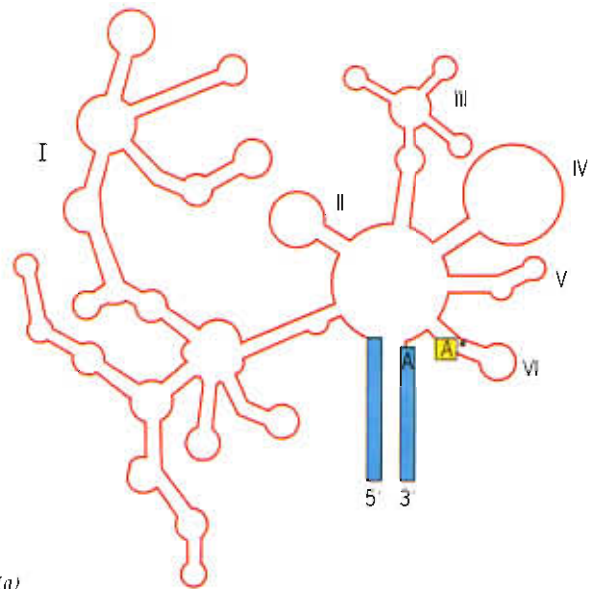


FIGURA 11-32. Estructura de los intrones del grupo I. En este modelo se indica la compleja estructura tridimensional del intrón del grupo I de *Tetrahymena*. Los dos exones que flanquean el intrón se muestran en color blanco. Como consecuencia del plegamiento del intrón, los dos exones se aproximan estrechamente hasta un punto donde pueden unirse luego de eliminar el intrón. Los pares de bases se indican como puentes fosfato-fosfato entre las cadenas apareadas. (Cortesía de E. Westhof.)

plo mejor estudiado de las complejas y dinámicas interacciones que pueden ocurrir entre moléculas de RNA. De los diferentes RNAnp que participan en el empalme del RNA se cree que el RNA U6 es el ribosoma que efectúa los dos cortes en el pre-RNAm requeridos para eliminar el intrón.

Puesto que la mayor parte de los genes contienen algunas secuencias interpuestas, las reacciones de empalme mostradas en la figura 11-36 deben ocurrir repetidas veces sobre un solo transcrito primario para eliminar todos los intrones del pre-RNAm. Las pruebas sugieren que los intrones se eliminan en un orden preferido generando intermediarios específicos de procesamiento cuyo tamaño varía entre el del transcrito primario y el RNAm maduro. En la figura 11-37 se muestra un ejemplo de los intermediarios formados durante el procesamiento nuclear de RNAm ovomucoide en las células del oviducto de la gallina.

FIGURA 11-33. Estructura y vía de autoempalmado de los intrones del grupo II. *a)* Estructura bidimensional de un intrón del grupo II. El intrón se pliega con seis dominios característicos. El asterisco indica el nucleótido de adenosina que sobresale del dominio VI y forma la estructura de lazo descrita abajo. Los dos extremos del intrón se aplican estrechamente entre sí, como se indica por la proximidad de los dos límites intrón-exón. *b)* Pasos en el autoempalmado de los intrones del grupo II. En el paso 1, el 2' OH de una adenosina dentro del intrón (asterisco en el dominio VI de la parte *a*) ataca el sitio de ensamblado 5', desdoblado el RNA y formando una rama 2'-5' con el primer nucleótido del intrón. Esta estructura ramificada se describe como lazo de vaquero. En el paso 2, el 3' OH libre del exón desplazado ataca al sitio 3' de empalme, que desdobra al RNA en el otro extremo del intrón. Como resultado de esta reacción, el intrón se libera como lazo de vaquero libre y los extremos 3' y 5' de los dos exones que flanquea quedan ligados (paso 3). Se sigue una vía similar en el empalme de intrones a partir de pre-RNA_m, pero ocurre más bien por autoempalmado. Estos pasos requieren la ayuda de algunos factores adicionales.

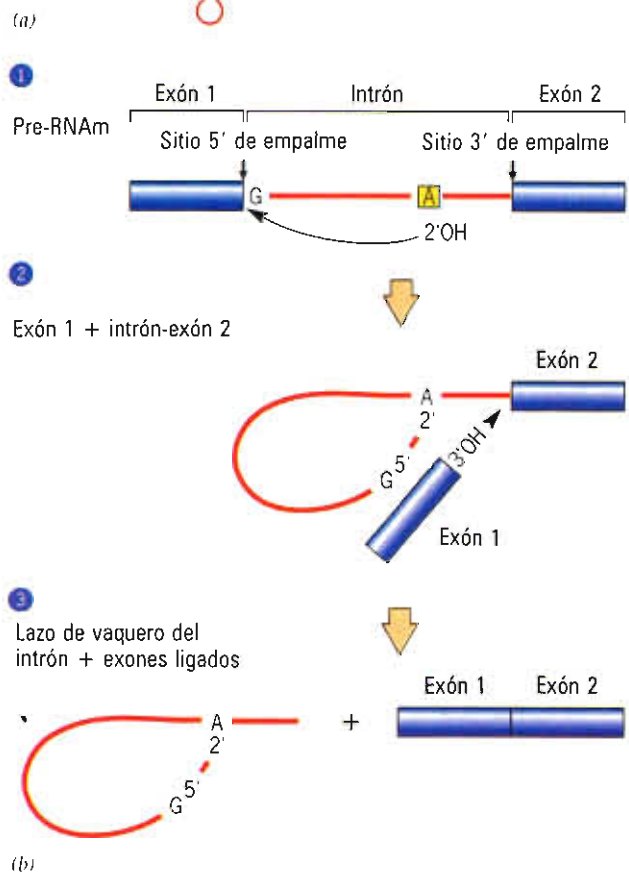


Implicaciones evolutivas del rompimiento de genes y el empalme de RNA

El descubrimiento de la capacidad del RNA para catalizar reacciones químicas tuvo un enorme impacto sobre nuestro concepto de la evolución biológica. Una de las preguntas fundamentales planteadas por los biólogos evolutivos desde el descubrimiento del DNA ha sido: ¿cuál fue el primer material genético, la proteína o el DNA? El dilema se origina en las funciones aparentemente no superpuestas de estos dos tipos de macromoléculas. Los ácidos nucleicos almacenan información, en tanto que las proteínas catalizan reacciones. Con el descubrimiento de los ribosomas fue evidente que un tipo de molécula, el RNA, podía hacer ambas cosas.

Estos datos condujeron a especular que durante las primeras etapas de la evolución de la vida no existían DNA ni proteína. Tal vez las moléculas de RNA pudieron haber ejecutado una doble tarea: sirvieron como material genético y como catalizadores de las reacciones enzimáticas necesarias. En esta etapa, la vida podía describirse como incluida en "un mundo de RNA". Sólo en la última etapa de la evolución "se conectaron" las funciones de almacenamiento de información y de catálisis al DNA y a la proteína, respectivamente, dejando al RNA la función primaria de "intermediario" en el flujo de información genética. Muchos investigadores opinan que el empalme es un buen ejemplo de herencia del mundo del RNA.

El descubrimiento reciente de intrones del grupo II en las bacterias púrpura y las cianobacterias, quizá parientes cercanos de los ancestros de las mitocondrias y los cloroplastos, respectivamente, arrojó nueva luz acerca de los ascendientes del empalme del RNA. Este dato apoya la hipótesis de que los intrones del grupo II son la fuente a partir de la cual se originaron los intrones pre-RNA_m. La hipótesis se presenta en la figura 11-38. Según esta hipótesis, los intrones originalmente estuvieron presentes en organismos endosimbióticos que residían en células eucariotas primitivas. Con el tiempo, los intrones dejaron el DNA del organelo e invadieron el DNA nuclear, donde establecieron su residencia permanente. La transferencia de las secuencias



DNA de las mitocondrias y los cloroplastos al núcleo celular está bien comprobada, de modo que el movimiento de DNA en esta dirección no es inesperado. Una vez en el núcleo, los intrones pudieron desplazarse de un sitio a otro mediante el proceso de transposición analizado en la página 414 del capítulo previo. El análisis de las secuencias de intrones sugiere que tienen capacidad de actuar como elementos genéticos móviles. Puesto que los intrones originalmente fueron ca-

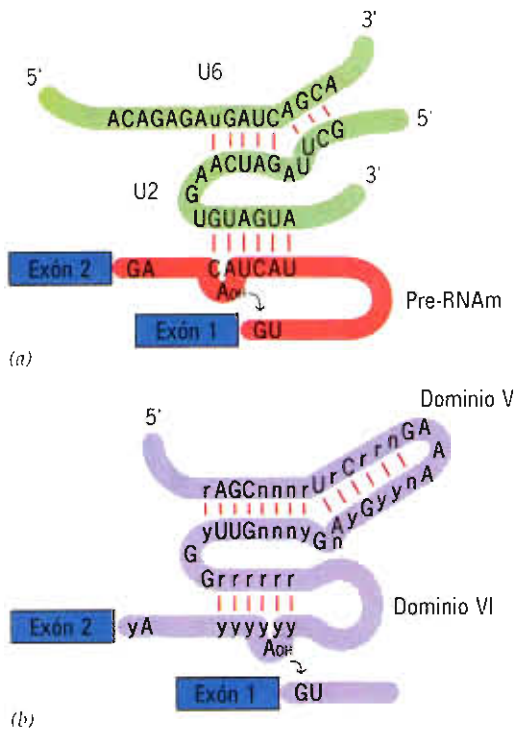


FIGURA 11-34. Semejanza estructural propuesta entre las reacciones de empalme efectuadas por el espliceosoma sobre pre-RNA y las reacciones de autoempalme del grupo II de intrones. *a)* Interacción estructural entre un intrón de una molécula pre-RNA (flanqueada por los exones 1 y 2) y dos RNAs (U2 y U6) requeridos para el empalme. *b)* Estructura de un intrón del grupo II que muestra la disposición de partes críticas que quedan alineadas durante el autoempalme (como se indicó en la figura previa). Es evidente la semejanza de las partes del intrón del grupo II al RNA combinado en la letra *a*. Arriba se muestran los residuos invariables en letras mayúsculas; las purinas y pirimidinas conservadas se denotan por *r* y *y*, respectivamente. Los residuos variables se marcan con *n*. (Según A.M. Weiner, Cell 72:162, 1993; con permiso de Cell Press.)

paces de autoensamblarse, su presencia a mitad de los genes no causaría problema porque las secuencias correspondientes a los intrones simplemente se cortan a sí mismas a partir de los transcritos de RNA primarios antes de convertirse en RNA. Con el tiempo, las porciones catalíticas de los intrones fueron separadas de los RNA más grandes como fragmentos aparte que continúan participando en el proceso de empalme. Tiempo después, la evolución conformó estos fragmentos en RNAs cuya actividad catalítica se volvió dependiente de la presencia de proteínas. En conjunto, RNAs y las proteínas evolucionaron para convertirse en los componentes RNP del espliceosoma. A medida que esto ocurría, los nucleótidos internos de los intrones no tuvieron ya función alguna, lo que explica su longitud variable y la divergencia en las secuencias de nucleótidos.

Aunque la presencia de intrones pudo haber creado una "carga" adicional a las células debido a que deben eliminar estas secuencias interpuestas de sus transcritos, los intrones tienen sus virtudes. Como veremos en el siguiente capítulo, el empalme de RNA es uno de los pasos sometido a regula-

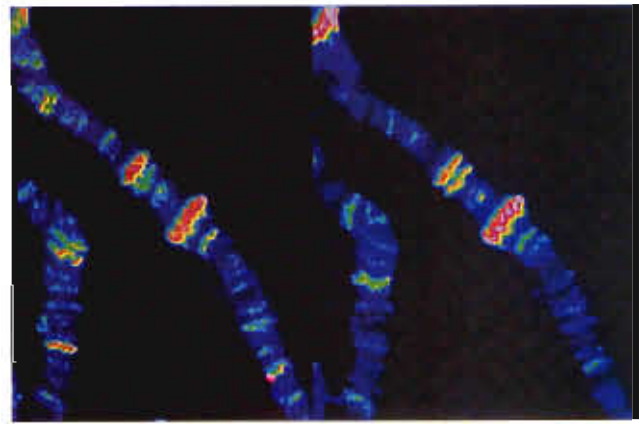
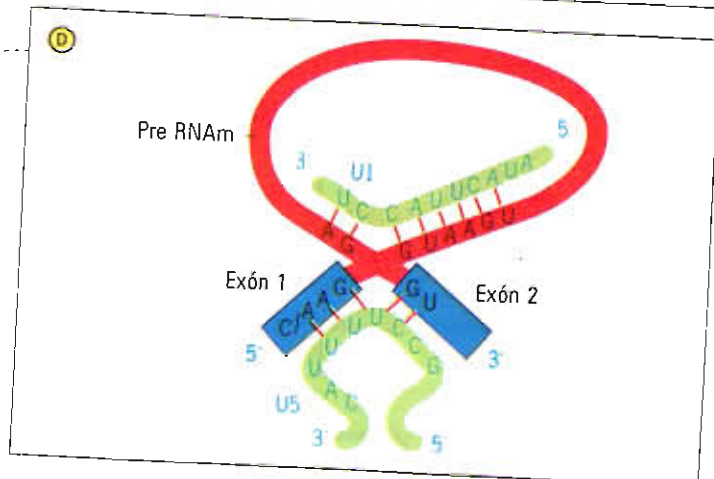
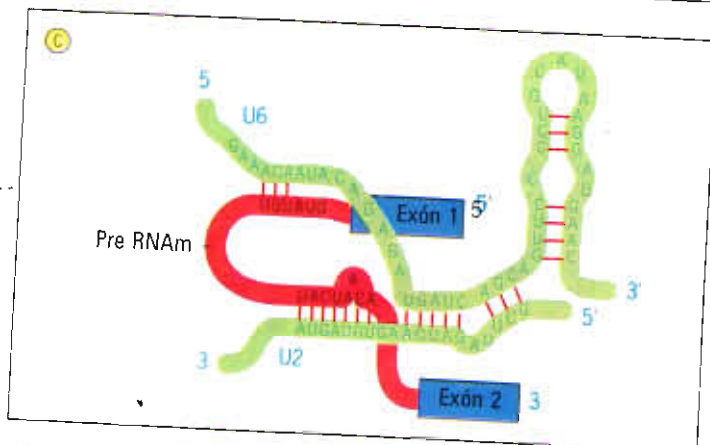
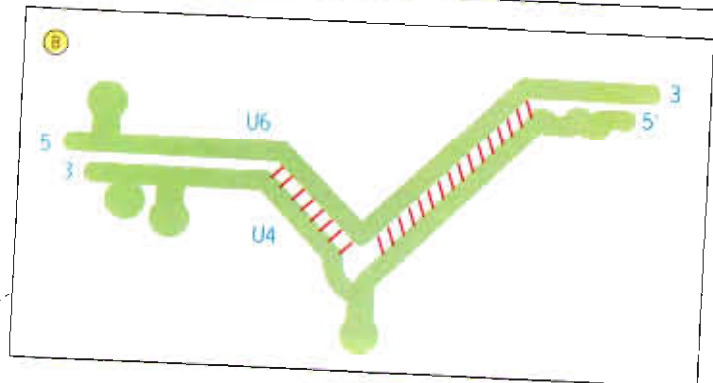
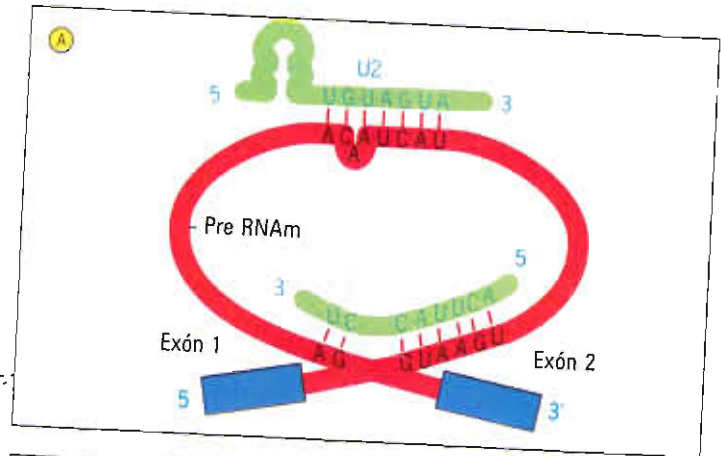
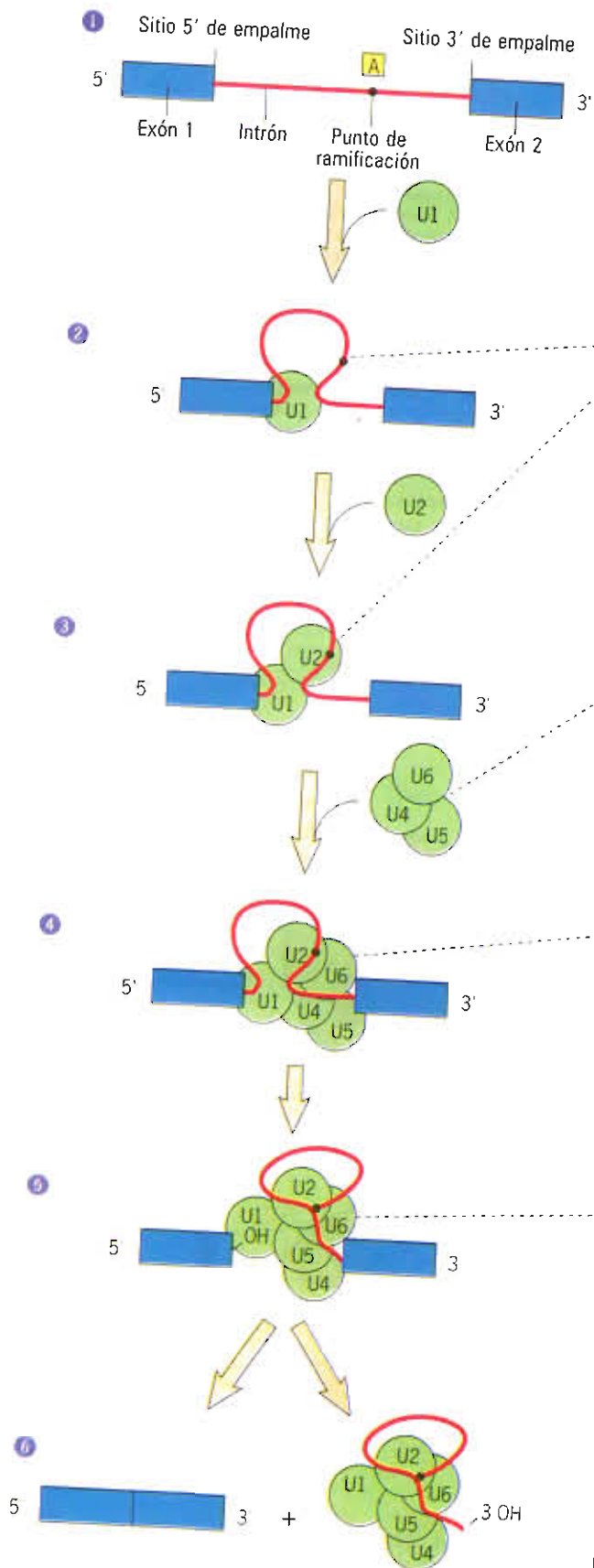


FIGURA 11-35. Demostración visual de la presencia de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (RNP) relacionadas con transcritos nacientes. Cromosomas politenos gigantes de las glándulas salivales de *Drosophila melanogaster* teñidos con anticuerpos fluorescentes contra la proteína de las partículas de RNP. Los anticuerpos fluorescentes brillantemente teñidos se enlazan de manera selectiva al material presente en las regiones esponjadas de los cromosomas, que son sitios donde ocurre la transcripción. (Según Erika L. Matunis, Michael J. Matunis y Gideon Dreyfuss, J. Cell Biol. 121:226, 1993; con permiso de Rockefeller University Press.)

FIGURA 11-36. Disposición del mecanismo de empalme a nivel del intrón y algunos de los pasos durante el empalme. El paso 1 muestra la porción del pre-RNA que será empalmada. En el paso 2, el primero de los componentes de empalme, U1 RNP, se encuentra fijo al sitio de empalme 5' del intrón. La secuencia de nucleótidos de U1 RNP es complementaria del sitio de empalme 5' del pre-RNA y muestra que U1 RNP inicialmente se enlaza al extremo 5' del intrón mediante la formación de un par de bases específicas entre el sitio de empalme y U1 RNP. U2 RNP es el siguiente en introducirse al complejo de empalme, enlazándose al pre-RNA (como se muestra en el recuadro A), de manera que un residuo de adenosina sobresale (punteado) por fuera de la hélice que lo rodea (paso 3). Este es el sitio que finalmente se transforma en el punto de ramificación del lazo de vaquero. El siguiente paso es el enlace de U4/U6 y U5 RNP al pre-RNA (paso 4). Una vez que todos los RNPs se encuentran enlazados al intrón, concluye la disposición del espliceosoma (paso 4), y está listo el escenario para una serie de interacciones dinámicas entre el pre-RNA y los RNAs específicos, y entre los propios RNAs. A medida que forman el complejo con pre-RNA, los RNAs U4 y U6 se aparean a las bases para formar un gran número de pares (recuadro B). Después de su entrada al complejo, los puentes de hidrógeno entre U4 y U6 se rompen y las regiones de U6 que forman pares con U4 se convierten en pares de bases para una porción de U2 RNP (recuadro C). Se cree que U6 es una ribozima y U4 un inhibidor de su actividad catalítica. Una vez que U4 RNP se desplaza, U6 RNP se encuentra en posición para efectuar los dos cortes requeridos para eliminar el intrón. También se piensa que U1 y U5 RNP vuelven a juntar los sitios de empalme para facilitar el desdoblamiento de los enlaces a cada lado del intrón (recuadro D). El ensamblado del espliceosoma va seguido por el desdoblamiento del sitio de ensamblado 5', formando un exón 5' libre y un intrón-3' de lazo de vaquero del exón intermediario (paso 5). Se cree que el exón 5' libre puede mantenerse en su sitio por su asociación a RNAs del espliceosoma. La primera reacción de desdoblamiento en el sitio 5' de empalme va seguida rápidamente por un segundo desdoblamiento en el sitio de empalme 3', que secciona al intrón del lazo de vaquero y simultáneamente junta los extremos de los dos exones vecinos (paso 6). Luego del empalme, el RNP tal vez se libere del pre-RNA como partícula individual que se pueda volver a ensamblar en los sitios de otros intrones.



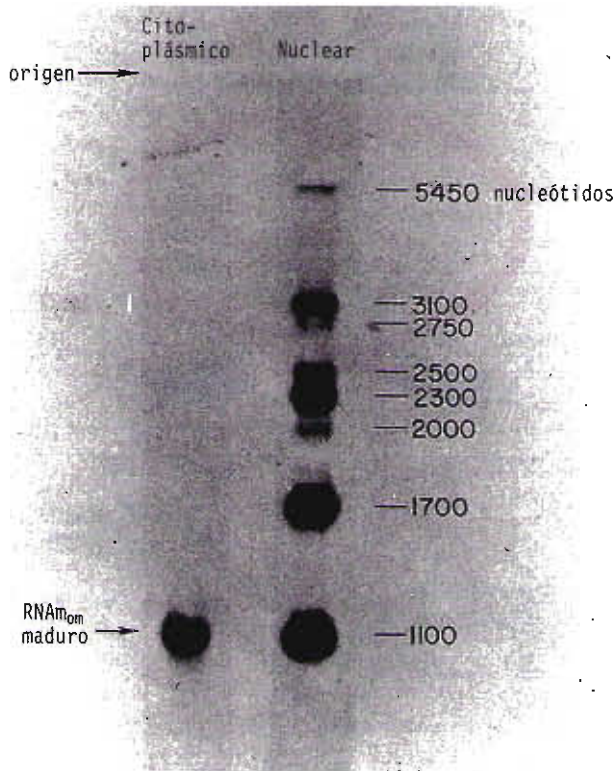


FIGURA 11-37. Procesamiento del RNAm ovomucoide. La fotografía muestra una técnica llamada mancha Northern, en la cual el RNA extraído (en este caso de núcleos de células del oviducto de gallina) se fracciona mediante electroforesis en gel y se extiende sobre papel filtro en forma de manchas. El RNA inmovilizado sobre el papel filtro se incuba con DNAc marcado con isótopo radiactivo (en este caso, el DNAc se elabora a partir del RNAm ovomucoide) para producir bandas que revelan la posición de los RNA con la secuencia complementaria. El RNAm maduro que codifica la proteína ovomucoide tiene 1 100 nucleótidos de largo y se muestra en la parte inferior de la mancha. Es evidente que el núcleo contiene algunos RNA de tamaño mayor que también contiene la secuencia de nucleótidos del RNAm ovomucoide. Los RNA más grandes situados sobre la mancha muestran una longitud de 5 450 nucleótidos que corresponde al tamaño de la unidad de transcripción ovomucoide; se supone que este RNA es el transcrito primario a partir del cual se copia finalmente el RNAm. Otras bandas prominentes contienen RNA con longitudes de 3 100 nucleótidos (correspondientes a un transcrito que carece de los intrones 5 y 6), 2 300 nucleótidos (transcrito que carece de los intrones 4, 5, 6 y 7) y 1 700 nucleótidos (transcrito que carece de todos los intrones, excepto el número 3). (Cortesía de Bert O'Malley.)

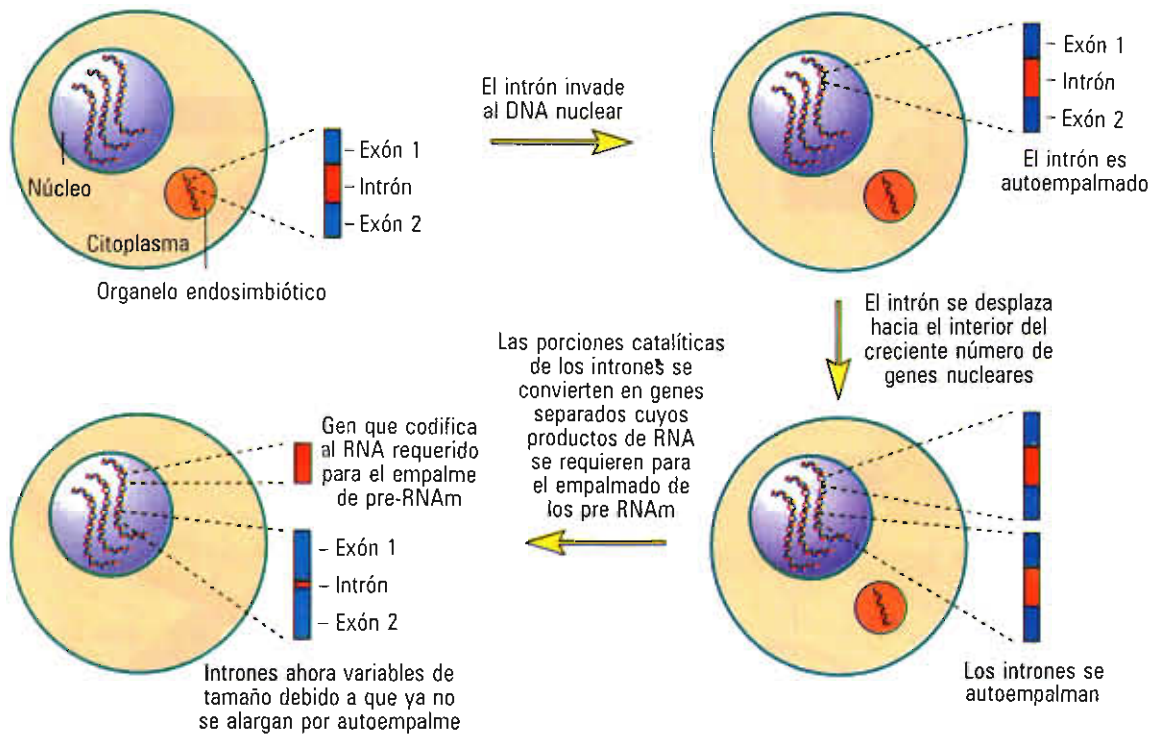


FIGURA 11-38. Hipótesis que puede explicar el origen evolutivo de los intrones en el DNA eucariota. Pasos propuestos en la evolución de un intrón autoempalmable en un simbiote ancestral procariota en el interior de intrones del genoma eucariota. Los pasos se analizan en el texto.

ción celular a lo largo de la vía para formar RNAm. Muchos transcritos primarios pueden procesarse en dos o más vías, de modo que la secuencia que actúa como intrón en una vía se convierte en exón en una vía alterna. Como resultado de este proceso, denominado *ensamblado alternativo*, el mismo gen puede codificar varios polipéptidos diferentes.

También se cree que la presencia de intrones tuvo mayor impacto en la evolución biológica. En la página 59 vimos que con frecuencia las proteínas se componen de segmentos distintos, o dominios, que funcionan de manera semindependiente. En algunos casos, los dominios de un polipéptido corresponden a la parte del mismo codificada por exones distintos. Por ejemplo, los receptores de LDL, proteínas que desempeñan un papel crucial en la captación de colesterol sanguíneo (pág. 314), se componen de partes que claramente son homólogas de partes de otras proteínas. Una porción central del polipéptido receptor de LDL contiene un dominio muy similar en estructura y secuencia a una porción de otra proteína llamada factor de crecimiento epidérmico (FCE). Este dominio es codificado por algunos exones vecinos que también están presentes en el gen FCE. Otro dominio del receptor de LDL se parece mucho a una porción de la proteína sanguínea denominada factor C9 del complemento codificada por una serie de exones similares a los observados en el gen C9. Es evidente que el gen que codifica al receptor de LDL se ha ensamblado de partes de otros genes (fig. 11-39).

El desplazamiento de “módulos” genéticos entre diferentes genes, proceso denominado **revolver los exones**, pudo haber participado de manera importante en el ensamblado

de ancestros de muchos de los genes presentes en los organismos actuales. Durante largos periodos, los exones pudieron ser revueltos independientemente en varias formas, permitiendo un número casi infinito de combinaciones en la búsqueda de nuevas y útiles secuencias de codificación. Gracias al entremezclado de los exones, la evolución no necesariamente ocurre sólo a través de la lenta acumulación de mutaciones puntuales, sino que también puede avanzar a “saltos cuánticos” con la aparición de nuevas proteínas literalmente de la noche a la mañana.

Creación de nuevos ribosomas en el laboratorio

El principal “punto difícil” en la mente de muchos biólogos respecto de la posibilidad de un mundo de RNA en el cual el RNA actúe como único catalizador, es que hasta ahora sólo se han encontrado unas pocas reacciones catalizadas por RNA *in la célula*. En la actualidad, éstas incluyen las reacciones de desdoblamiento y de ligadura requeridas para el empalmado del RNA y la formación de enlaces peptídicos durante la síntesis de proteínas. En la actualidad, varios grupos de investigadores exploran el *potencial* catalítico del RNA creando nuevas moléculas de RNA en el laboratorio. Con uno de los métodos adoptados se modifica de diferente manera el RNA existente y se prueba su capacidad de participar en nuevos tipos de actividades. Por ejemplo, se ha demostrado que algunos RNA modificados pueden catalizar ciertas reacciones químicas que serían necesarias si el RNA fuera capaz de autoduplicarse. Puesto que la autoduplicación es una propiedad fundamental de la vida, este dato apoya la existencia de un “antiguo mundo de RNA”.

Otros grupos de investigadores están creando los RNA deseados a partir de “raspado” sin ningún diseño preconcebido de cómo se debe construir el RNA. El RNA se forma permitiendo que máquinas automáticas sintetizadoras de DNA ensamblen el DNA con secuencias de nucleótidos *al azar* y luego transcriban el DNA para formar una vasta población de RNA cuyas secuencias de nucleótidos también se determinan al azar. Una vez obtenida una población de RNA, se pueden seleccionar miembros individuales de la población en virtud de las propiedades particulares que poseen. Este método se describe como “evolución molecular en el laboratorio”.

En un grupo de estudios se seleccionó RNA sintético por su capacidad para enlazarse a un ligando particular, como el trifosfato de nucleósido o un péptido, mediante cromatografía por afinidad (sección 17-7). En estos experimentos, los ligandos se unen a esferitas, utilizadas luego para empacar una columna de cromatografía. Cuando se permite que la preparación de RNA se deslice a través de la columna, los RNA capaces de enlazarse al ligando inmovilizado son retirados de la solución, en tanto que la mayor parte de las moléculas de RNA simplemente pasan a través sin ser afectadas. Una vez seleccionada la subpoblación de RNA se puede incrementar su número y someter a otra vuelta selectiva bajo condiciones más estrictas. Con cada vuelta selectiva, los RNA que “pasan la prueba” cada vez son más adecuados para la tarea que se les impone.

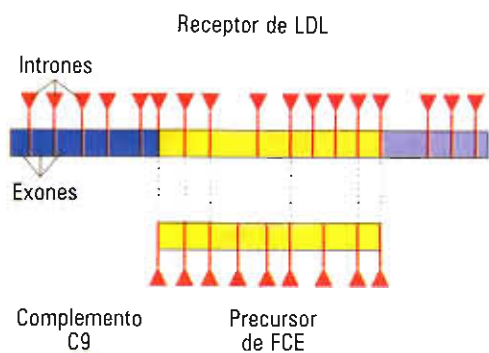


FIGURA 11-39. Origen de los exones del gen que codifica el receptor de LDL. Los 18 exones que constituyen el gen para el receptor de LDL se muestran en la parte de arriba; las flechas indican la posición de los 17 intrones. El receptor de LDL contiene una secuencia de aminoácidos que muestra una homología distinta para el factor de crecimiento epidérmico (FCE) y la proteína del complemento C9. Los estudios indican que el gen para el receptor de LDL contiene una región (mostrada en azul) que corresponde al gen del complemento C9 y otra región (indicada en amarillo) que corresponde al gen que codifica al precursor para el factor de crecimiento epidérmico. El gen para el precursor del FCE se muestra en la parte inferior de la figura con sus exones delimitados. Algunos de los exones del gen precursor del FCE corresponden a los exones del gen receptor de LDL, otros no. Es de suponer que los intrones únicos para uno u otro gen aparecieron después del ensamblado del gen receptor de LDL durante la evolución. (Según B. Lewin, *Genes*, p. 697, Oxford University Press, 1994.)

LA PERSPECTIVA HUMANA

Posible uso de las ribozimas en medicina

Las ribozimas poseen dos propiedades importantes que los convierten en agentes potenciales de la lucha contra ciertas enfermedades crónicas: 1) contienen tramos de nucleótidos que les permiten formar pares de bases con un RNA complementario y 2) tienen un sitio catalítico capaz de desdoblar el esqueleto del RNA complementario (fig. PH 11-1). Con estas propiedades, las ribozimas son sujetos ideales para manipulación en ingeniería genética, puesto que se pueden diseñar a la medida para reconocer y destruir cualquier RNA específico.

Ya se inició el uso de ribozimas diseñadas a la medida en la lucha contra enfermedades virales. Para que un virus dañe a una célula infectada, el genoma viral debe transcribirse en RNA viral, que posteriormente se traduce en proteínas virales. Consideremos lo que ocurre si una célula infectada posee un gen que codifica a una ribozima capaz de enlazarse específicamente y destruir el RNA viral. Podría esperarse que la célula fuese inmune contra el virus, aunque el genoma viral se encuentre integrado al DNA de las células huésped. Experimentos recientes efectuados por Flosie Wong-Staal, de la Universidad de California, y Arnold Hempel, de la Northern Illinois University, demostraron la posibilidad de utilizar ribosomas de esta manera.

En sus experimentos, Wong-Staal y Hempel aislaron linfocitos T de pacientes con SIDA y transfectaron las células (sección 17-12) con una secuencia de DNA manipulada por ingeniería genética que codifica una ribozima capaz de reconocer y desdoblar RNA del HIV. El gen para ribozimas se coloca hacia abajo de un promotor "fuerte", que garantiza su transcripción activa. Las pruebas indican que la ribozima reduce la cantidad de virus producido por células infectadas con HIV por un factor aproximado de 10 000 en comparación con células infectadas con

HIV no transfectadas. Lo más importante es que la ribozima evidentemente es eficaz para destruir el RNA viral sin dañar al RNA normal de la célula. El siguiente paso en el proyecto es iniciar ensayos clínicos a gran escala en los cuales se introducen linfocitos portadores de un gen para ribozima de regreso al cuerpo del paciente del cual se tomaron las células. Se espera que las células transfectadas sean resistentes al virus y preserven el sistema inmunitario deficiente del paciente.

El objetivo final de esta geneterapia es introducir el gen para ribozimas destructores de RNA en todas las células del cuerpo infectadas por el virus y no sólo en aquellas presentes en la circulación sanguínea. Como se analizó en la página 153, se han desarrollado diferentes vectores para suministrar genes extraños a diferentes sitios del cuerpo.

Las ribozimas también pueden ser útiles en la lucha contra ciertos tipos de cáncer. Como se estudia en el capítulo 16, se ha demostrado que ciertos tipos de cáncer humano son resultado de una mutación en un gen (un oncogen) que codifica una proteína que participa en la regulación de la división celular. Puesto que la malignidad de estas células se debe a la síntesis de un RNA diferente del producido por una célula normal, sería factible revertir el estado maligno de la célula destruyendo el RNA alterado, tarea apropiada para una ribozima. Se han aislado células del cáncer humano de la vejiga y se han transfectado con un gen diseñado a la medida que codifica un ribosoma capaz de reconocer y destruir el RNA transcrito del oncogen alterado. Normalmente, las células vesicales malignas pueden causar tumores cuando se inyectan a ratones de la-

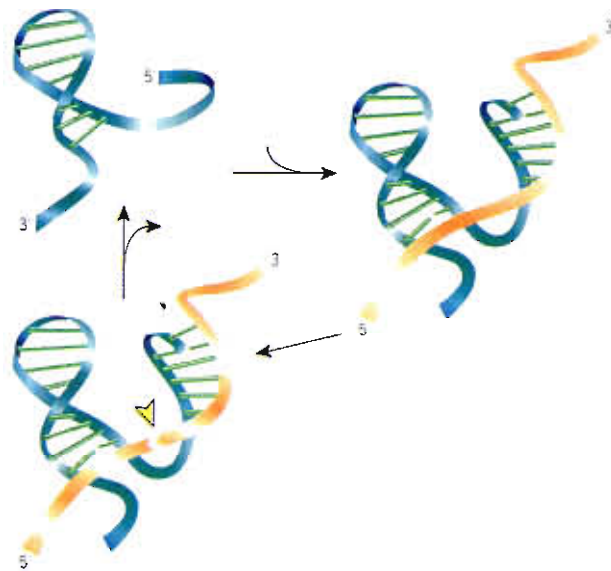


FIGURA PH 11-1. Acción de una ribozima. La ribozima que aquí se muestra, llamada ribozima de cabeza de martillo, es capaz de enlazarse al RNA que tiene una secuencia complementaria de nucleótidos y catalizar una reacción para desdoblar el esqueleto del sustrato del RNA. (Reimpreso con permiso de T.R. Cech y O.C. Uhlenbeck, *Nature* 372:39, 1994; copyright 1994 por Macmillan Magazines Ltd.)

boratorio, pero las células cancerosas transfectadas con la ribozima pierden sus propiedades malignas y ya no son capaces de formar tumores en el ani-

mal huésped. Para ser eficaz como tratamiento para el cáncer, el gen que codifica el ribosoma tendrá que introducirse en todas las células del tumor, lo

cual, como se analizó antes, requiere el desarrollo de un vector capaz de entregar el gen a los tejidos internos del cuerpo.

Es de esperar que un RNA que se enlaza con gran afinidad a un ligando posea actividad catalítica capaz de modificar dicho ligando. Esta expectativa se cumplió en experimentos recientes en los cuales inicialmente se seleccionaron RNA capaces de unirse al ATP y después se eligió una subpoblación que hidroliza ATP y transfiere el grupo fosfato al extremo de otro RNA. La transferencia de un grupo fosfato del ATP a un donador adecuado es uno de los tipos de reacciones más importantes efectuadas por enzimas de proteínas en las células vivientes. La demostración de que un ribosoma sintético puede catalizar una reacción de este tipo añade mayor credibilidad al concepto de que las moléculas de RNA son capaces de catalizar todas las reacciones requeridas para mantener la vida de una célula primitiva antigua.

11-4 Codificación de la información genética

Una vez descrita la estructura del DNA era evidente que la secuencia de aminoácidos de un polipéptido fuera especificada por la secuencia de nucleótidos en el DNA de un gen. Parecía poco probable que el DNA pudiera servir como plantilla física directa para el ensamblado de una proteína. En vez de eso, se asumió que la información almacenada en la secuencia de nucleótidos se presentaba en algún tipo de **código genético**. Con el descubrimiento del RNA mensajero como intermediario del flujo de información del DNA a la proteína, la atención se orientó a investigar de qué manera una secuencia "escrita" en un "alfabeto" ribonucleotídico puede codificar una secuencia "escrita" en un "alfabeto" muy diferente de aminoácidos.

Propiedades del código genético

Uno de los primeros modelos del código genético fue postulado por el físico George Gamow, quien propuso que cada aminoácido de un polipéptido estaba codificado por una secuencia de tres nucleótidos. En otros términos, las palabras del código, o **codones**, para aminoácidos eran tripletos de nucleótidos. Gamow llegó a esta conclusión con una lógica un poco de escritorio. Razonó que deben *requerirse* cuando menos tres nucleótidos por cada aminoácido que posea su propio codón único. Consideremos el número de palabras que se pueden deletrear utilizando un alfabeto de cuatro letras diferentes correspondientes a las cuatro bases po-

sibles que pueden ocurrir en un sitio particular del DNA (o el RNAm). Con una letra hay cuatro palabras posibles, 16 palabras posibles con dos letras y 64 (4^3) posibles palabras con tres letras. Puesto que se deben especificar 20 aminoácidos diferentes (palabras), los codones deben contener cuando menos tres nucleótidos sucesivos (letras). Pronto se comprobó en diferentes experimentos de genética la existencia del triplete natural.

Además de proponer que el código era un triplete, Gamow también propuso que es un código *superpuesto*. Consideremos la siguiente secuencia de nucleótidos:

—AGCAUCGCAUCGA—

Si el código está superpuesto, entonces el ribosoma se moverá a lo largo del RNAm avanzando un nucleótido cada vez y reconociendo un nuevo codón con cada movimiento. En la secuencia precedente, AGC especificaría un aminoácido, GCA el siguiente aminoácido, CAU el siguiente, y así sucesivamente. Sin embargo, si el código no estuviera *superpuesto*, cada nucleótido a lo largo del RNAm sería parte de uno y sólo un codón.

Se pueden extraer conclusiones acerca de la superposición o no superposición del código a partir de estudios en proteínas mutantes, como la hemoglobina mutante que causa la anemia drepanocítica. En la anemia drepanocítica, como en muchos otros casos estudiados, se observó que en la proteína mutante se ha sustituido un solo aminoácido. Si el código estuviera superpuesto a un cambio en uno de los pares de bases del DNA debería afectar a tres codones consecutivos (fig. 11-40) y, por lo tanto, a tres aminoácidos consecutivos en el polipéptido correspondiente. Sin embargo, si el código no está superpuesto y cada nucleótido es parte de un solo codón, entonces sería de esperar la sustitución de un solo aminoácido. Estos y otros datos indican que el código no está superpuesto y que la proposición de Gamow al respecto era incorrecta.

El uso de un código no superpuesto añade una dificultad técnica al ribosoma. Puesto que el ribosoma se mueve a lo largo del RNAm una distancia equivalente a tres nucleótidos a la vez, entonces la secuencia de aminoácidos que se ensambla al ribosoma es determinada por los tripletos particulares "leídos". Una vez unido el ribosoma a un RNAm comienza a leer el primer codón y siempre se desplaza a lo largo en bloques consecutivos de tres nucleótidos. Para garantizar la lectura de los tripletos apropiados, el ribosoma se fija al RNAm en un sitio preciso llamado **codón de inicio**, AUG, que automáticamente coloca al ribosoma en el cua-

Secuencia de bases	Codones	
Secuencia original ... AGCATCG ...	Código superpuesto ... , AGC, GCA, CAT, ATC, TCG, ...	Código no superpuesto ... , AGC, ATC, ...
Secuencia después de la sustitución de una sola base ... AGAATCG ...	Código superpuesto ... , <u>AGA</u> , <u>GAA</u> , <u>AAT</u> , ATC, TCG, ...	Código no superpuesto ... , <u>AGA</u> , ATC, ...

FIGURA 11-40. Distinción entre un código genético superpuesto y uno no superpuesto. Efecto de la sustitución de una sola base en el RNAm sobre el contenido de información en cada uno de estos dos tipos de código. Los codones afectados se muestran subrayados en rojo.

dro de lectura apropiado, de modo que lea correctamente todo el mensaje desde ese punto en adelante. Por ejemplo, en el siguiente caso,

—CUAGUUACAUGCUCCAGUCCGU—

el ribosoma se desplaza desde el codón de inicio, AUG, a los siguientes tres nucleótidos, CUC, y así sucesivamente a lo largo de toda la línea. Algunas de las mutaciones más destructivas son aquellas que sólo añaden o borran un par de bases al DNA. Un ejemplo de adición de un solo nucleótido a la secuencia previa se ilustra por

—CUAGUUACAUGCUCGCAGUCCGU—

Las mutaciones de este tipo se denominan **mutaciones por cambio de cuadro** y causan que el ribosoma se mueva a lo largo del RNAm en el cuadro de lectura incorrecto desde el punto de la mutación hacia el resto de la secuencia codificadora. Como resultado, estas mutaciones con cambio de cuadro conducen a ensamblar una secuencia enteramente anormal de aminoácidos desde el punto de la mutación hasta el extremo del polipéptido. Irónicamente, después de más de veinte años asumiendo que el ribosoma siempre se mueve de un tripleto al siguiente, se han descubierto varios ejemplos donde el RNAm contiene una *señal de recodificación* para que el ribosoma cambie su cuadro de lectura, de ordinario regresando un nucleótido hacia atrás (cambio al cuadro -1) o saltando un nucleótido (cambio al cuadro +1).

Considerando que los organismos emplean un código de tripletos con capacidad para especificar 64 aminoácidos diferentes y que en realidad sólo hay 20 aminoácidos para especificar, se plantea la pregunta sobre cuál es la función de los 44 tripletos extra. Hay tres posibilidades: todos ellos, algunos de ellos o ninguno de ellos codifica aminoácidos. Si alguna de las dos primeras posibilidades es correcta, entonces cuando menos uno de los aminoácidos será especificado por más de un codón. Se dice que un código de este tipo está *deteriorado*. Como después se comprobó, el código está muy deteriorado, puesto que casi los 64 codones posibles especifican aminoácidos. Los que no lo hacen (3 de los 64) tienen una función especial: el ribosoma los reconoce como codones de terminación y detienen la lectura del mensaje.

El deterioro del código fue pronosticado originalmente por Francis Crick sobre fundamentos teóricos cuando consideró la extensa gama de composición de bases por diferentes DNA bacterianos. Por ejemplo, se observó que el contenido de G + C podía variar de 20 a 74%, en tanto que la composición de aminoácidos en las proteínas de estos organismos mostraba poca variación total. Esto sugirió que los mismos aminoácidos eran codificados por diferentes secuencias de bases, lo que constituía el deterioro del código.

Identificación de los codones

En 1961 ya se conocían las propiedades generales del código, pero aún no se descubría alguna codificación específica asignada a los tripletos. En aquel tiempo, casi todos los genetistas pensaban que debían transcurrir cinco a 10 años antes de descifrar todo el código. Pero Marshall Nirenberg y Heinrich Matthaei dieron un gran paso cuando desarrollaron una técnica para sintetizar sus propios "mensajes genéticos" artificiales y luego determinar qué tipo de "proteína" codificaban. El primer mensaje sometido a prueba fue un polirribonucleótido compuesto exclusivamente de uridina; el mensaje se denominó "poli(U)". Cuando se añadió poli(U) al tubo de ensaye que contenía un extracto bacteriano con los 20 aminoácidos además de los materiales necesarios para la síntesis de proteínas (ribosomas y varios factores solubles), el sistema siguió las instrucciones del mensajero artificial y elaboró un polipéptido. Analizando el polipéptido ensamblado se observó que era una polifenilalanina, un polímero del aminoácido fenilalanina. Nirenberg y Matthaei habían demostrado así que el codón UUU especifica fenilalanina.

En los siguientes cuatro años, varios investigadores se unieron a la búsqueda y se elaboraron otros RNAm sintéticos para probar las especificaciones de aminoácidos de todos los 64 codones posibles. El resultado fue la carta descodificadora universal o "código genético" mostrado en la figura 11-41 (el pie de la figura contiene las instrucciones para leer la carta). Las asignaciones suministradas al codón en la figura 11-41 son prácticamente universales: cualquiera que sea el tipo de célula, como bacteria, levadura, hongo, pino gigante de California o ser humano, los mismos codones especifican a los mismos aminoácidos. La principal excepción a la universalidad del código genético se observa en los codones del RNAm mitocondrial. Por ejemplo, en la mito-

EL CODIGO GENETICO

1ª letra	U	C	A	G	2ª letra
U	Fenilalanina	Serina	Tirosina	Cisteína	U
	Fenilalanina	Serina	Tirosina	Cisteína	C
	Leucina	Serina	Paro	Paro	A
	Leucina	Serina	Paro	Triptófano	G
C	Leucina	Prolina	Histidina	Arginina	U
	Leucina	Prolina	Histidina	Arginina	C
	Leucina	Prolina	Glutamina	Arginina	A
	Leucina	Prolina	Glutamina	Arginina	G
A	Isoleucina	Treonina	Asparagina	Serina	U
	Isoleucina	Treonina	Asparagina	Serina	C
	Isoleucina	Treonina	Lisina	Arginina	A
	Metionina (inicio)	Treonina	Lisina	Arginina	G
G	Valina	Alanina	Acido aspártico	Glicina	U
	Valina	Alanina	Acido aspártico	Glicina	C
	Valina	Alanina	Acido glutámico	Glicina	A
	Valina	Alanina	Acido glutámico	Glicina	G

3ª letra

Ejemplo de RNAt

Codón: UGC

A C G

Codón: CAC

G U G

Codón: GGA

C C U

FIGURA 11-41. El código genético. La correlación entre codón y aminoácidos indicada en esta carta descodificadora es igual casi en todos los organismos. Por ejemplo, para emplear la carta en la traducción del codón UGC se debe encontrar la primera letra (U) sobre el renglón indicado a la izquierda. Seguir este renglón a la derecha hasta encontrar la segunda letra (G), indicada en la parte de arriba; a continuación encontrar el aminoácido que coincide con la tercera letra (C) en la fila de la derecha. UGC especifica la introducción de cisteína. Cada aminoácido (excepto 2) posee varios codones que ordenan su introducción. Estos son "sinónimos" genéticos, sistemas de respaldo que reducen el peligro de que mutaciones letales destruyan las células. Como se analiza en la siguiente sección, la descodificación en las células la efectúa el RNAt, algo de lo cual se ilustra esquemáticamente a la derecha de la figura.

condria humana, UGA se lee como triptófano en vez de alto, AUA se lee como metionina en vez de isoleucina, y AGA y AGC se leen como paro en vez de arginina. Aun con estas discrepancias, las similitudes de los códigos genéticos mitocondrial y nuclear sobrepasan con mucho sus diferencias y en general se cree que uno se derivó del otro, y que todos los organismos presentes sobre la tierra en la actualidad comparten un origen evolutivo común.

El examen de la carta de codones de la figura 11-41 indica claramente que la asignación de aminoácidos no es al azar. Más bien, hay una semejanza evidente en los codones que especifican el mismo aminoácido. Como resultado, las mutaciones espontáneas que provocan cambios en el gen de una sola base con frecuencia no producen cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína correspondiente. La comparación de las secuencias de nucleótidos de la misma proteína entre especies diferentes indica que se acumu-

lan muchas más sustituciones de nucleótidos que no cambian la secuencia de aminoácidos de la proteína en comparación con las sustituciones que sí causan cambios. El aspecto del "margen de seguridad" del código es más importante que el de su deterioro. La asignación a los codones es tal que aminoácidos *similares* tienden a ser especificados por codones similares. Por ejemplo, los codones de diferentes aminoácidos hidrofóbicos se agrupan en las primeras dos columnas de la carta. Por consiguiente, la sustitución de una base en uno de estos codones probablemente sustituya a un residuo hidrofóbico por otro. Además, las principales semejanzas entre aminoácidos y codones relacionados aparecen en los primeros dos nucleótidos del triplete, en tanto que la mayor variabilidad ocurre en el tercer nucleótido. La explicación de este fenómeno se revela en la siguiente sección, donde se describe el papel del RNA de transferencia.

Descodificación de los codones: papel de los RNA de transferencia

Ácidos nucleicos y proteínas son como dos lenguajes escritos con diferentes tipos de letra. ¿Cómo puede la información codificada en una secuencia de nucleótidos controlar el ensamblado secuencial de aminoácidos en una proteína? A fines de los años 1950, Francis Crick propuso una respuesta a esta pregunta con base en su convicción de que la manera predominante para que un ácido nucleico exprese su especificidad era mediante la formación de uniones de hidrógeno entre nucleótidos complementarios. Crick postuló la existencia de una molécula "adaptadora" de ácido nucleico, la cual "descodificaría" el mensaje genético de los nucleótidos para convertirlo en aminoácido. Cada aminoácido tendría su propia especie de adaptador, y de esta manera, una secuencia específica de bases podría traducirse en una cadena

definida de polipéptidos. Esta era una hipótesis atrevida: predecir un tipo de molécula enteramente nueva con base en la lógica bioquímica y no en su aislamiento. Poco tiempo después se descubrió el RNA de transferencia en la fase soluble del citoplasma celular, y casi de inmediato se confirmó su papel como adaptador en la síntesis de proteínas.

Puesto que cada RNAt puede reconocer dos diferentes tipos de moléculas, un RNAm y un aminoácido, debemos considerar de qué manera tienen lugar ambas formas de reconocimiento. Sin embargo, primero analizaremos la estructura de las moléculas del RNAt que les permite efectuar estas funciones. En 1965, luego de siete años de trabajo, Robert Holley, de la Universidad Cornell, publicó la primera secuencia de bases de una molécula de RNA, la del RNA de levadura específico para el aminoácido alanina (fig. 11-42, *a*). Esta molécula RNAt se compone de 77 nucleótidos, 10 de los cuales son modificaciones de los cuatro nucleótidos

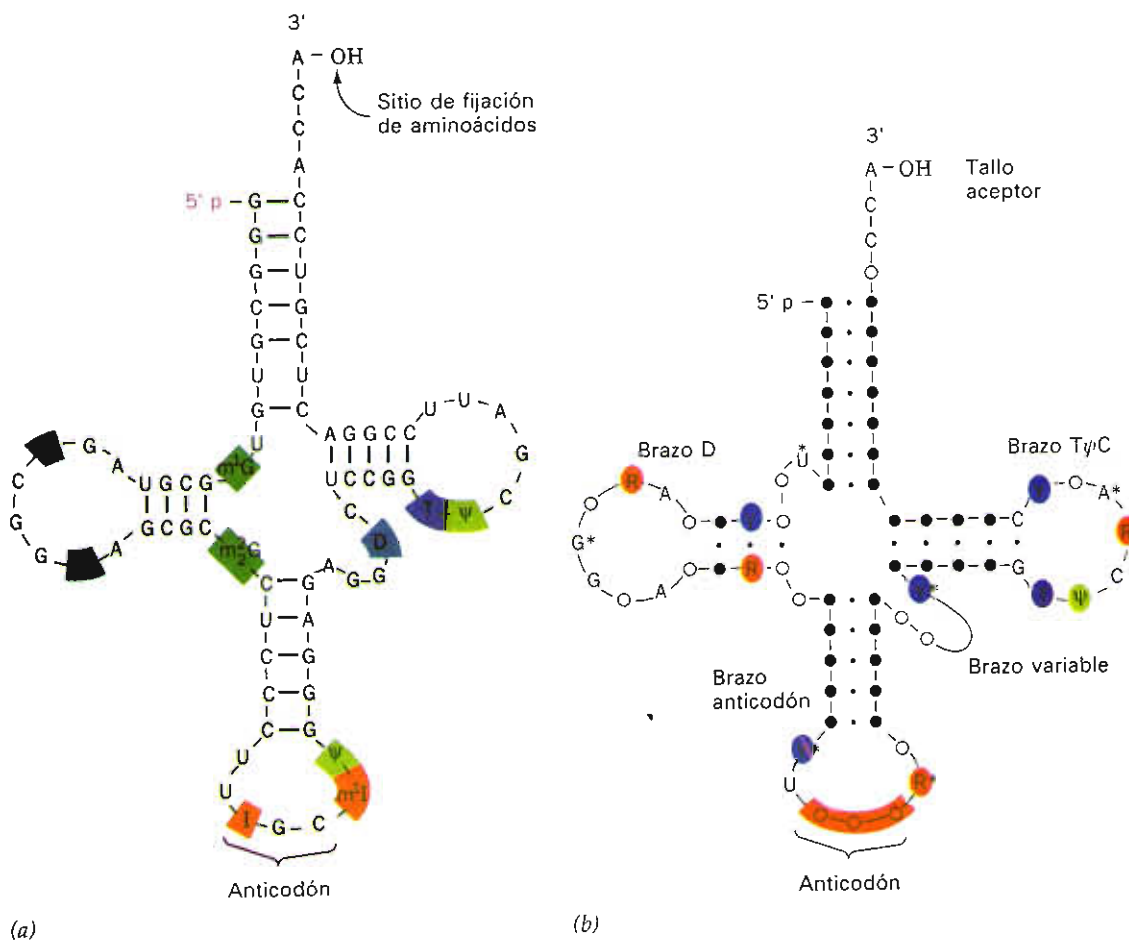


FIGURA 11-42. Estructura bidimensional del RNA de transferencia. *a*) Secuencia de nucleótidos en forma de hoja de trébol de RNAt^{Ala} de levadura. Los aminoácidos se encuentran unidos al extremo 3' del RNAt, en tanto que el extremo opuesto posee el anticodón, en este caso IGC. La función del anticodón se analiza más adelante. Además de las cuatro bases, A, U, G y C, este RNAt contiene ψ, pseudouridina; T, ribotimidina; ml, metilinosina; l, inosina; me₂G, dimetilguanosina; D, dihidrouridina; meG, metilguanosina. Los sitios de las 10 bases modificadas en este RNAt se indican por el sombreado en color. *b*) Representación generalizada del RNAt en forma de hoja de trébol. Las bases comunes a todos los RNAt (procariota y eucariota) se indican con letras; R es una purina invariable, Y es una pirimidina invariable, ψ es una pseudouridina invariable. Los círculos claros indican sitios donde las bases participan en la formación de pares de bases no de Watson-Crick. A menudo, pero no siempre, los nucleósidos mostrados se modifican. La mayor variabilidad entre los RNAt ocurre en el brazo V (variable), que puede oscilar de 4 a 21 nucleótidos. Hay dos sitios de menor variabilidad a lo largo del brazo D.

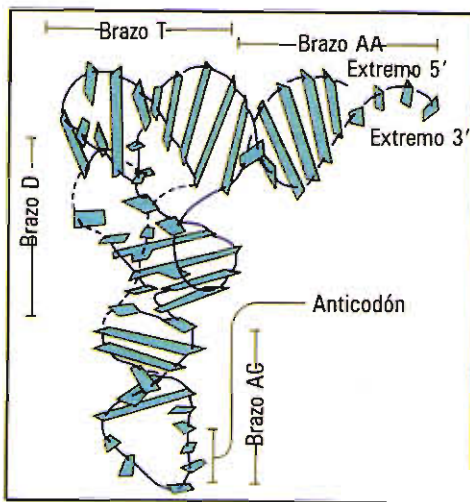
estándar (A, G, C, U) del RNA, como lo indica el sombreado de la figura.

En los siguientes años se publicaron y secuenciaron algunas otras especies de RNAt y se observaron varias similitudes en todos los diferentes RNAt (fig. 11-42, b). Todos ellos constan casi del mismo pequeño número de nucleótidos, entre 73 y 93, y todos tienen un porcentaje significativo de bases poco comunes que al parecer son resultado de modificaciones enzimáticas de una de las cuatro bases estándar *después* que se incorporan a la cadena de RNA (es decir, luego de la transcripción). Además, todos los RNAt poseen secuencias de nucleótidos en una parte de la molécula que son complementarias de secuencias localizadas en otras partes de la molécula. A causa de estas secuencias complementarias, todos los RNAt tienen posibilidad de plegarse de igual manera para formar una estructura parecida a una hoja de trébol. En la figura 11-42 se muestran los tallos con pares de bases y las asas no apareadas de las hojas de trébol del RNAt. El aminoácido siempre se fija a la A en el extremo 3' de la molécula. Las bases poco comunes, que se concentran en las asas, actúan para interrumpir la formación de puentes de hidrógeno en estas regiones y también sirven como sitio potencial de reconocimiento para enzimas.

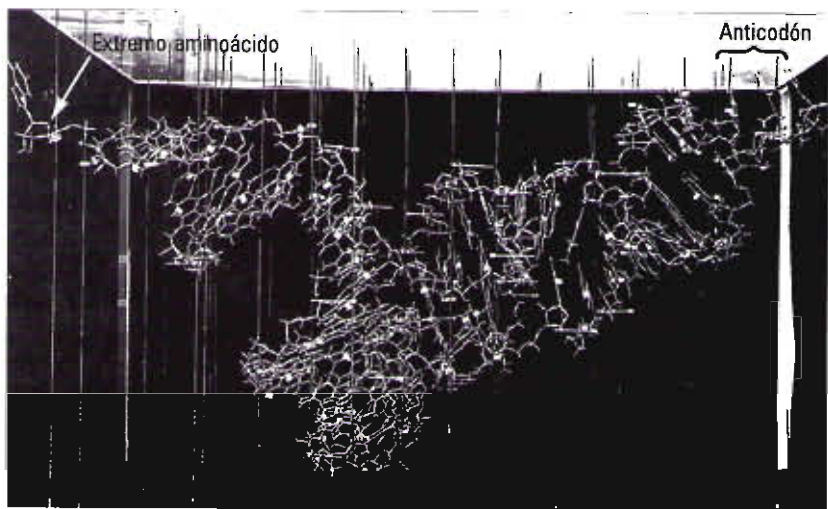
Hasta este punto sólo se ha considerado la estructura secundaria o bidimensional de estas moléculas adaptadoras. Los RNA de transferencia pueden plegarse para formar una estructura terciaria única definida. El análisis de difracción de rayos X demuestra que los RNAt asumen forma de L (fig. 11-43). Como en el caso de la estructura terciaria de las proteínas, el plegamiento de una molécula de RNAt se facilita por la formación de enlaces débiles entre partes de otra

manera distantes de la molécula. Las bases observadas en sitios comparables en toda molécula de RNAt (bases *invariantes* de la figura 11-42, b) tienen particular importancia para generar la estructura terciaria común en forma de L. La forma común de todos los RNAt refleja el hecho de que todos deben tomar parte en la misma serie de reacciones durante la síntesis de proteína. Sin embargo, al mismo tiempo, varias enzimas deben distinguir los diferentes RNAt, de modo que el aminoácido apropiado se pueda fijar a su RNAt apropiado (conocido).

Los RNA de transferencia se encargan de leer las palabras en el alfabeto nucleótido del RNAm y asegurarse de traducirlas a las palabras apropiadas en el alfabeto aminoácido de la proteína. El reconocimiento entre una molécula de RNAt determinada y un tripleto de RNAm determinado (codón) se logra por la formación de puentes de hidrógeno entre secuencias de bases complementarias sobre los RNA de transferencia y mensajeros. La parte del RNAt que participa en esta interacción específica con el codón del RNAm es un tramo de tres nucleótidos secuenciales, denominado **anticodón**, que se localiza en el asa media de la molécula de RNAt (fig. 11-43, a). En todos los RNAt, esta asa se compone de siete nucleótidos, los tres de en medio formando el anticodón. El análisis de la estructura terciaria indica que el anticodón se localiza en un extremo de la molécula de RNAt en forma de L, opuesto hacia el cual el aminoácido se encuentra fijo (fig. 11-43, b). Conforme el RNAt se enlaza secuencialmente a su codón complementario del RNAm, los aminoácidos que transporta se ensamblan de modo secuencial en una cadena de polipéptidos. Como resultado, la secuencia de nucleótidos del RNAm controla la secuencia de aminoácidos del polipéptido.



(a)



(b)

FIGURA 11-43. Estructura tridimensional de un RNAt. a) Dibujo esquemático. El brazo aceptor de aminoácidos (AA) y el brazo TψC (T) forman una doble hélice continua, y el brazo anticodón (AC) y el brazo D forman la otra doble hélice parcialmente continua. Estas dos columnas helicoidales forman una L. El esqueleto de fosfato-ribosa se muestra como una fibra continua, excepto por los tres segmentos punteados en los cuales varía el número de nucleótidos entre los diferentes RNAt. b) Fotografía de un modelo de 2.5 Å de un fenilalanil RNAt de levadura tomada por B.F.C. Clark y J.E. Ladner utilizando coordenados suministrados por A. Klug. La distancia del anticodón al extremo 3' terminal es de casi 8 nm. (a. Reimpreso con permiso de S.-H. Kim, *Nature* 256:680, 1975; copyright 1975 por Macmillan Magazines Limited; b. cortesía de B.F.C. Clark.)

Puesto que son 61 los diferentes codones que puede especificar un aminoácido, sería de esperar que una célula tuviera cuando menos 61 diferentes RNAt, cada uno con un anticodón diferente complementario de uno de los codones de la figura 11-41. Pero recordemos que las más grandes similitudes entre codones que especifican el mismo aminoácido ocurren en los primeros dos nucleótidos del tripleto, en tanto que la mayor variabilidad en estos mismos codones ocurre en el tercer nucleótido del tripleto. Consideremos los 16 codones que terminan en U. En cada caso, si la U cambia a C, se especifica el mismo aminoácido (primeras dos líneas de cada cuadro en la figura 11-41). De manera similar, en la mayor parte de los casos, un cambio entre una A y una G en el tercer sitio tampoco tiene efecto en la determinación del aminoácido. La posibilidad de intercambiar la base de la tercera posición llevó a Francis Crick a proponer que el mismo RNA de transferencia puede reconocer más de un codón. Su proposición, llamada *hipótesis de la inestabilidad*, sugiere que en tanto el requerimiento estérico entre el anticodón del RNAt y el codón del RNAm pueda ser muy estricto para las primeras dos posiciones, quizá sea más flexible en la tercera posición, lo que permite a dos codones que especifican el mismo aminoácido y que sólo difieren en la tercera posición puedan emplear el mismo RNAt en la síntesis de proteínas. Una vez más, la hipótesis de Crick resultó correcta.

Las reglas que gobiernan la inestabilidad en la tercera posición del codón son las siguientes (fig. 11-44): la U del anticodón puede formar par con A o G del RNAm; la G del anticodón puede formar par con U o C del RNAm; y la I (inosina, derivada de la guanina en la molécula de RNAt original) del anticodón puede formar par con U, C o A del RNAm. La hipótesis de la inestabilidad se comprobó demostrando que ciertas moléculas de RNAt purificado se unen a más de un codón para el aminoácido especificado. Como consecuencia de la inestabilidad, los seis codones para leucina, por ejemplo, sólo requieren tres RNAt.

Activación de aminoácidos

Durante la síntesis de proteína es de gran importancia que cada molécula de RNA de transferencia se una al aminoácido "correcto" (conocido). Los aminoácidos se unen mediante enlaces covalentes a los extremos 3' de su RNAt conocido por acción de una enzima llamada **aminoacil-RNAt sintetasa**. Una aminoacil-RNAt sintetasa específica reconoce cada aminoácido, la cual es capaz de "cargar" todos los RNAt

apropiados para aquel aminoácido (o sea, todos los RNAt cuyos anticodones reconozcan los diferentes codones para ese aminoácido, como se indica en la figura 11-41). Las aminoacil-RNAt sintetetas constituyen un excelente ejemplo de la especificidad de las interacciones proteína-ácido nucleico. Deben existir ciertas características comunes entre todas las especies de RNAt de un aminoácido determinado para permitir a la enzima apropiada del grupo reconocer todos estos RNAt y al mismo tiempo discriminar todos los RNAt para otros aminoácidos. Se ha determinado la estructura tridimensional de varias de estas enzimas (fig. 11-45) y se ha venido acumulando información acerca de las características estructurales de los RNAt que pueden causar que sean seleccionados o rechazados como sustratos. Puesto que los sustratos de RNAt para las diferentes aminoacil-RNAt sintetetas son tan parecidos, se podría pronosticar que las enzimas también son similares entre sí. En realidad, representan un conjunto más bien heterogéneo de proteínas que se cree han evolucionado a partir de diferentes proteínas ancestrales. Es posible que esas enzimas aparecieran en una etapa muy primitiva de la evolución antes que muchas otras partes del mecanismo de traducción.

Las aminoacil-RNAt sintetetas efectúan la siguiente reacción en dos pasos:

Primer paso: $\text{ATP} + \text{aminoácidos} \rightarrow$

aminoacil-AMP + PP_i

Segundo paso: $\text{aminoacil-AMP} + \text{RNAt} \rightarrow$

aminoacil-RNAt + AMP

En el primer paso, la energía del ATP se emplea para "activar" el aminoácido mediante la formación de un aminoácido adenilado que se enlaza a la enzima. Este es el paso primario de requerimiento de energía en todo el proceso de ensamblado del polipéptido. Los acontecimientos subsecuentes, como la transferencia del aminoácido a la molécula RNAt (paso 2 de arriba), y finalmente el crecimiento de la cadena de polipéptidos, son todos termodinámicamente favorables. El PP_i producido en la primera reacción se hidroliza a continuación para formar P_i , forzando aún más la reacción total hacia la formación de productos (durante la síntesis de proteínas se consume energía, pero no se emplea en la formación de uniones peptídicas). El segundo paso en la formación de una molécula de RNAt cargada tiene lugar cuando la enzima transfiere su aminoácido en-

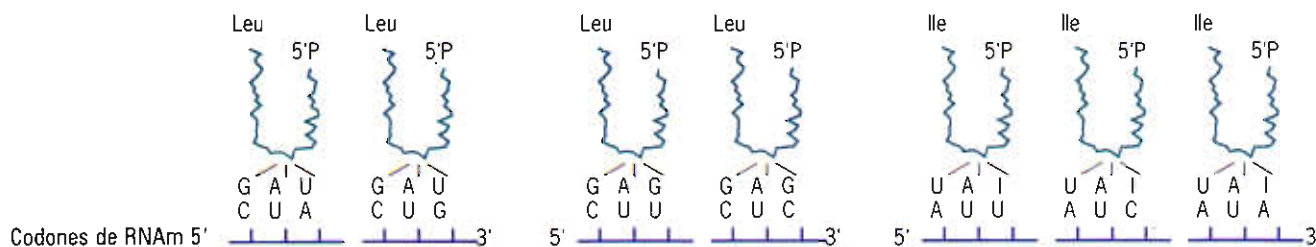


FIGURA 11-44. Flexibilidad en la interacción entre codones y anticodones. En algunos casos, el nucleótido situado en el extremo 5' del anticodón del RNAt puede formar par con más de un nucleótido situado en el extremo 3' (tercera posición) del codón de RNAm. En consecuencia, el mismo RNAt puede usar más de un codón. Las reglas para la formación de parejas flexibles se indican en la figura y también en el texto.

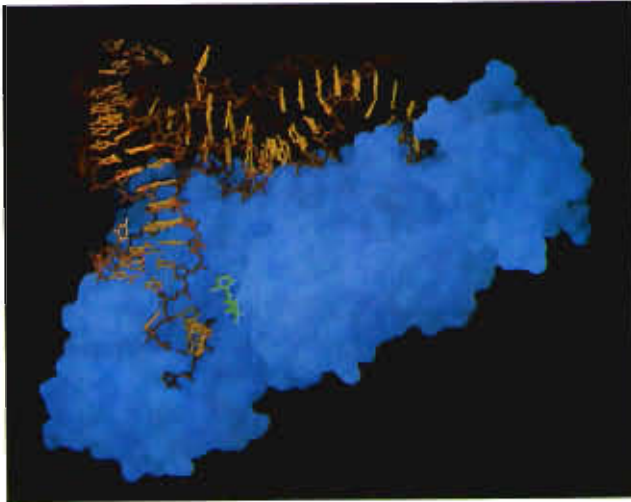


FIGURA 11-45. Modelo tridimensional de la interacción entre un RNAt y su aminoacil-RNAt sintetasa. Estructura de cristal de glutamyl-RNAt sintetasa de *E. coli* (en azul) que forma un complejo con RNAt^{Gln} (en rojo y amarillo). La enzima reconoce este RNAt específico y puede identificarlo entre otros a través de extensas interacciones con el tallo aceptor y el anticodón del RNAt. (Según Thomas A. Steitz, *Science* vol. 246, cover of 12/1/89 issue.)

lazado al extremo 3' del RNAt conocido. Si por alguna razón la sintetasa coloca un aminoácido particular sobre un RNAt inapropiado, se activa un mecanismo de control de calidad de la enzima y se secciona la unión entre el aminoácido y el RNAt.

A partir del análisis anterior, es evidente que el aminoácido en sí no desempeña un papel directo para determinar si se coloca en un polipéptido. Más bien, los codones del RNAm se interpretan según la capacidad de reconocimiento de la aminoacil-RNAt sintetasa. Esto se demostró en uno de los primeros experimentos efectuados por Fritz Lipmann y sus colaboradores, cuando alteraron químicamente un aminoácido *después* de fijado a su RNAt específico (fig. 11-46). En ese experimento, estos investigadores prepararon primero RNAt de cisteína cargado con cisteína. Posteriormente

te convirtieron la cisteína fijada en alanina y observaron el efecto que esto tenía sobre la incorporación del aminoácido. No tuvo efecto. El grupo de reconocimiento del RNAt, que es su anticodón, no mostró alteraciones y, por lo tanto, siguió reconociendo los mismos nucleótidos del RNAm como si no se hubiera alterado químicamente el aminoácido. Por consiguiente, siempre que se encontró una cisteína codificada en el mensaje se incorporó una alanina en la cadena del polipéptido.

11-5 Traducción de la información genética

La síntesis o traducción de proteínas es la actividad sintética más compleja que ocurre en la célula. En tanto que otras macromoléculas de las células se elaboran por medio de reacciones enzimáticas relativamente directas, el ensamblado de una proteína requiere todos los diferentes RNAt con sus aminoácidos unidos, ribosomas, RNA mensajeros y algunas proteínas con varias funciones, cationes y GTP. La complejidad no es sorprendente si consideramos que la síntesis de proteínas requiere la incorporación de cada uno de los diferentes 20 aminoácidos en la secuencia precisa dictada por un mensaje codificado escrito en un lenguaje que emplea distintos símbolos. En la descripción siguiente, casi siempre nos referimos a los mecanismos de traducción que operan en células bacterianas. El proceso es notablemente similar en células eucariotas. La diferencia principal es que la traducción en células eucariotas implica numerosos factores proteínicos solubles (no ribosómicos).

La síntesis de una cadena de polipéptidos se puede dividir en tres actividades distintivas: **inicio**, **alargamiento** y **terminación** de la cadena. Consideraremos por separado cada una de estas actividades.

Inicio

En la figura 11-47 se ilustran los pasos básicos del inicio de la traducción en procariotes. Es indispensable que el ribosomo

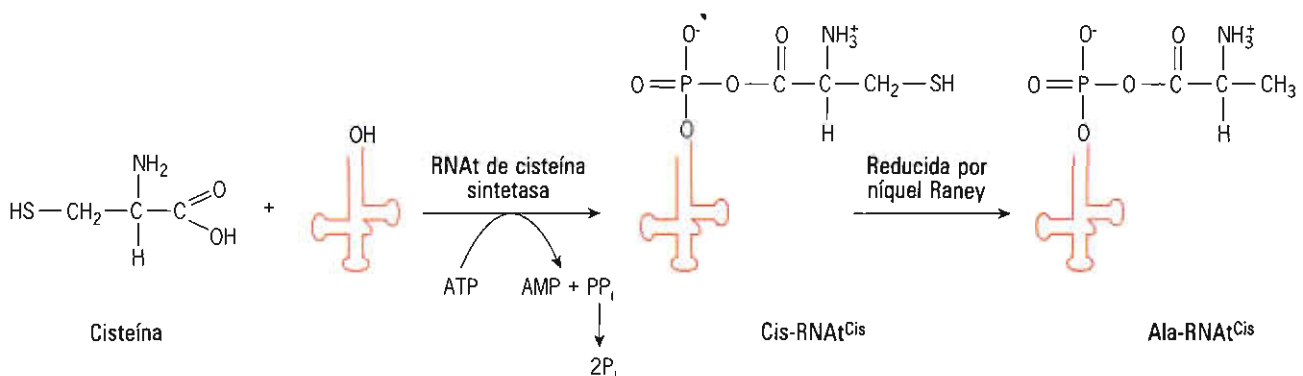


FIGURA 11-46. Demostración experimental de que la especificidad de la incorporación de un aminoácido es determinada por RNAt y no por el aminoácido fijado. La sustitución de una cisteína por una alanina luego que se ha fijado a RNAt^{Cis} no afecta su incorporación a la cadena de polipéptido; o sea, la alanina se incorpora en los sitios que normalmente ocupan los residuos de cisteína.

ma se fije a un punto determinado sobre el RNAm de modo que el mensaje se lea en el cuadro de lectura correcto (pág. 466). Esto se logra obligando al ribosoma a iniciar la traducción en un sitio específico del mensaje, llamado **codón inicial**. Como pronto será evidente, el RNAm no se enlaza a ribosomas intactos, sino más bien el mensaje lo hace a subunidades pequeñas y grandes en etapas separadas. El primer paso principal de inicio es el enlace de la subunidad ribosómica pequeña a la primera (o a una de las primeras) secuencia AUG del mensaje, la cual sirve como codón inicial.³

¿Cómo puede la subunidad pequeña seleccionar el codón AUG inicial en comparación con algún otro codón interno? Los RNAm bacterianos poseen una secuencia específica de nucleótidos (llamada secuencia Shine-Dalgarno, por sus descubridores) que reside cinco a 10 nucleótidos antes del codón inicial. La secuencia Shine-Dalgarno es complementaria de una secuencia de nucleótidos cercana al extremo 3' del RNA ribosómico 16S en la subunidad ribosómica pequeña.



El reconocimiento del codón inicial AUG es resultado de la interacción entre estas secuencias complementarias en el RNAm y el RNAr conforme la subunidad pequeña se enlaza al mensaje. En eucariotes, la subunidad ribosómica pequeña reconoce primero el extremo 5' del mensaje que precede al casquete de metilguanosa (pág. 456), y luego se desplaza a lo largo del RNAm hasta alcanzar una secuencia de nucleótidos (típicamente 5'-CCACCAUGC-3') que contiene el tripleto AUG en un contexto en el cual se le puede reconocer como codón inicial. En casi 90% de los RNAm eucariotas, el primer tripleto AUG es el codón de inicio.

Cuando se examinan las asignaciones de codones (fig. 11-41) se puede observar que AUG es algo más que un simple codón inicial; es el único codón para metionina. En realidad, la metionina siempre es el primer aminoácido que se incorpora al extremo N terminal de la cadena naciente de polipéptido. (En los procariotes, la metionina inicial posee un grupo formilo que lo convierte en *N*-formilmetionina.) En la mayor parte de los casos, la metionina (o *N*-formilmetionina) posteriormente se elimina mediante acción enzimática, pero la metionina permanece como aminoácido N terminal en casi 50% de las cadenas de polipéptido maduras. Las células poseen dos metionil-RNAt distintos: uno se usa para iniciar la síntesis de proteínas (designado RNAt^{Met}) y otro diferente (designado RNAt^{Met}) para incorporar residuos metonilo al interior de un polipéptido. Es interesante que mitocondrias y cloroplastos de células eucarióticas usan *N*-formilmetionina para iniciar la traducción en vez de metionina, dato que suministra una de las piezas más fuertes en el argumento del origen procariota de estos organelos.

Varios de los pasos delineados en la figura 11-47 requieren la ayuda de proteínas solubles, llamadas **factores de inicio** (designados FI en los procariotes y FIE en eucariotes). Por ejemplo, se cree que el FIE4E en eucariotes se enlaza al casquete situado en el extremo 5' del RNAm y es mediador de la interacción entre el mensaje y la subunidad

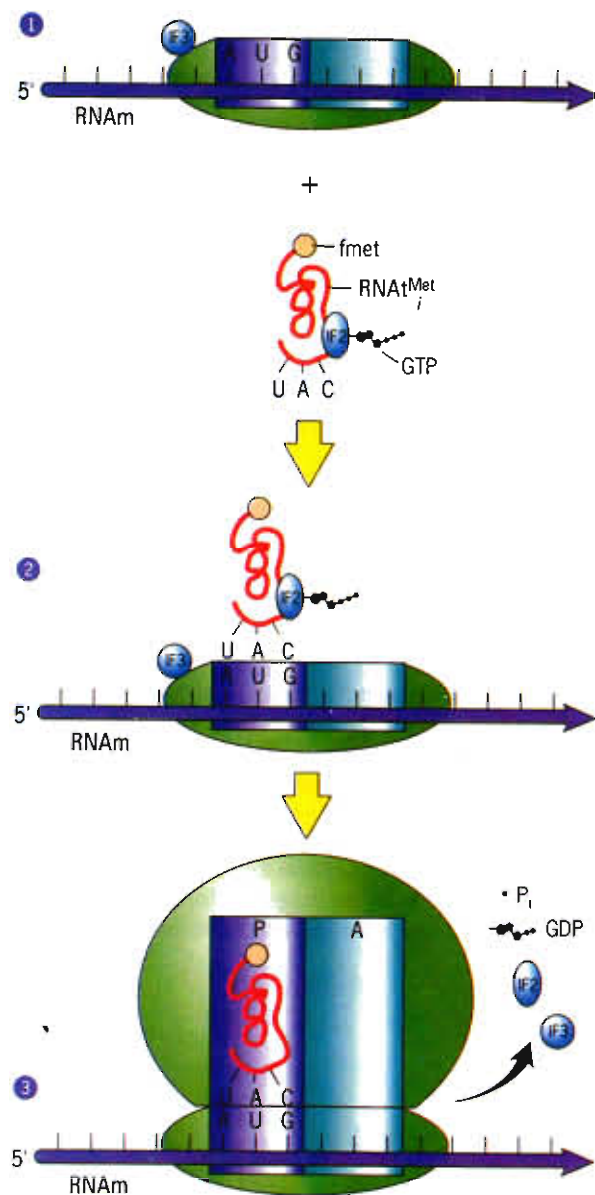


FIGURA 11-47. Pasos en el inicio de la síntesis de proteína en procariotes. En el paso 1, la subunidad ribosómica 30S a la cual se encuentra fijo el factor de inicio FI3 se enlaza al RNAm en el codón de inicio AUG. Esta interacción es facilitada por una interacción que ocurre entre una secuencia complementaria de nucleótidos situados sobre el RNAr y el RNAm, según se indica en el texto. En el paso 2, *N*-formilmetionil-RNAt (RNAt^{Met}) con el factor de inicio FI2 enlazado y GTP, se enlaza al complejo subunidad 30S-RNAm. A continuación se hidroliza GTP. En el paso 3, la subunidad 50S se une al complejo con la liberación acompañante de FI2, FI3 y los productos de la hidrólisis del GTP (GDP y P_i).

³ GUG también puede servir como codón inicial y se observa como tal en unos pocos mensajes naturales. Cuando se usa GUG, todavía se utiliza *N*-formilmetionina para formar el complejo inicial a pesar de que los codones GUG internos especifican valina.

ribosómica pequeña. Un factor acompañante se desliza a lo largo del extremo 5' del mensaje eliminando cualquier región de doble cadena que pudiera impedir los movimientos del ribosoma a medida que se desliza en busca del codón inicial. Además de los factores proteínicos, también se requiere GTP para que el inicio tenga éxito. Una molécula de GTP se enlaza al RNAt^{Met} antes que entre la subunidad ribosómica pequeña. Una vez que el RNAt iniciador se fija, la subunidad grande se une al complejo, los factores solubles se liberan y el GTP se hidroliza. La hidrólisis de GTP tal vez provoque un cambio de conformación en el ribosoma, requerido para el inicio de la traducción.

Cada ribosoma tiene dos sitios para asociarse a las moléculas de RNA de transferencia (fig. 11-48). Estos dos sitios, llamados **sitio A (aminoacilo)** y **sitio P (peptídico)**, tienen papeles diferentes en la traducción. Por lo general, el sitio A es en el que entra el aminoacil-RNAt al complejo RNAm ribosómico, en tanto que el sitio P es donde el RNAt dona aminoácidos a la cadena en crecimiento.⁴ El RNAt iniciador (RNAt^{Met}) probablemente aparezca al principio en el sitio P del ribosoma, según se indica en la figura 11-47.

Alargamiento

Con el RNAt iniciador firmemente cargado en su lugar dentro del sitio P, el ribosoma queda disponible para la entra-

⁴ En la actualidad se acepta un tercer sitio, llamado sitio E (salida, del inglés *exit*), como sitio separado donde el RNAt abandona el ribosoma después de donar su aminoácido al extremo de la cadena en crecimiento. Puesto que esto añade poco al análisis, se omite la referencia al sitio E, pero se indica en la figura 11-48.

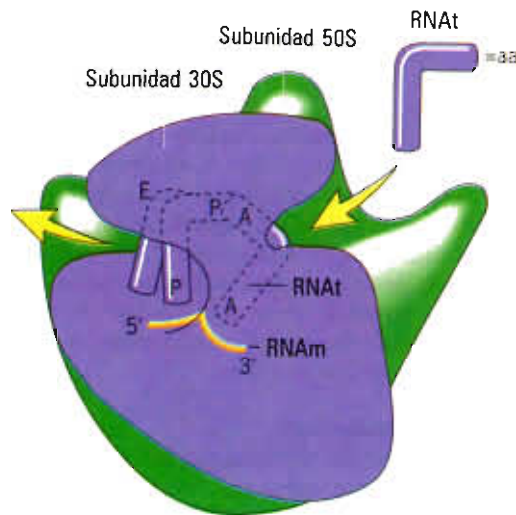


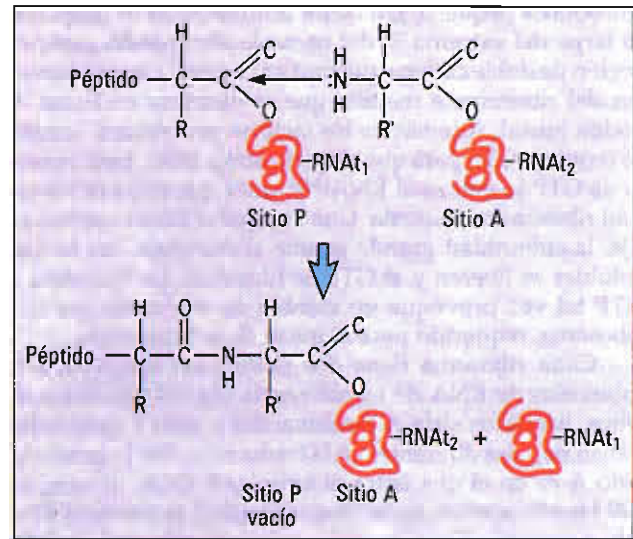
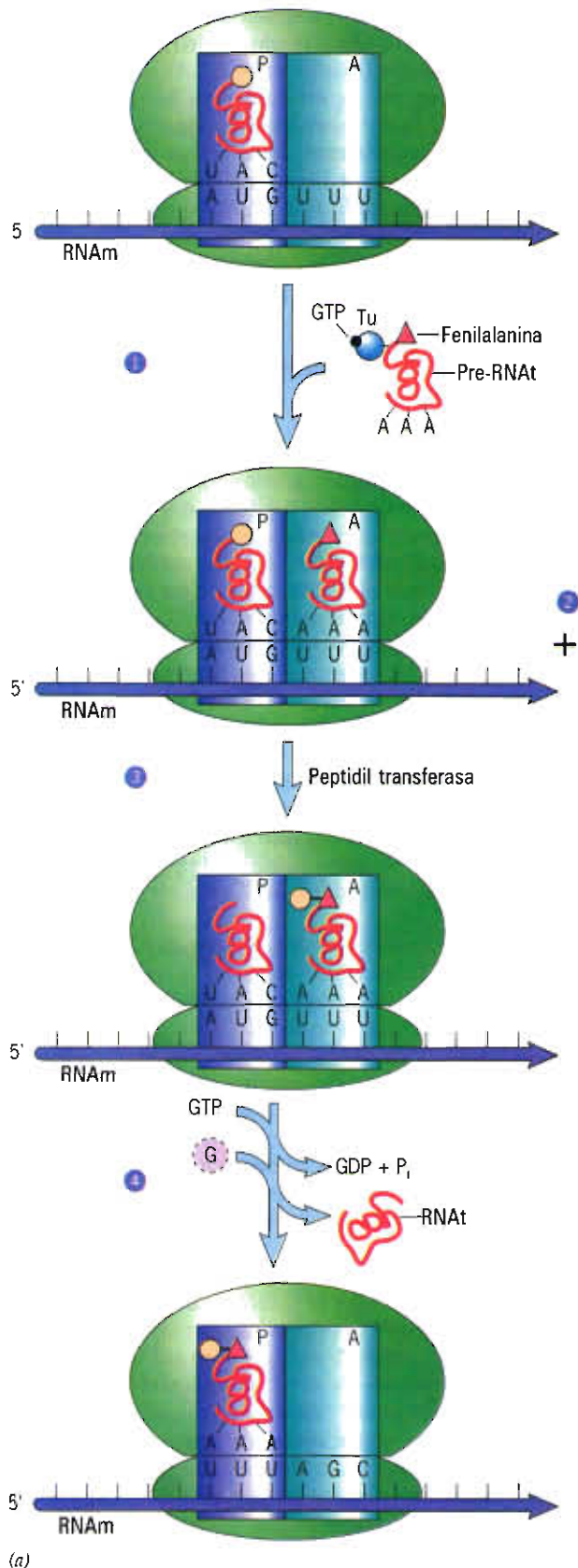
FIGURA 11-48. Localización aparente para el ribosoma enlazado al RNAt en los sitios A, P y E. Se muestra la polaridad del RNAm. Las flechas indican la probable vía de un RNAt cuando se desliza hacia adentro y afuera del ribosoma. El sitio E, a partir del cual sale el RNAt del ribosoma, no se analiza en el texto.

da de un segundo aminoacil-RNAt en el sitio A vacante, lo cual es el primer paso en el alargamiento (paso 1, fig. 11-49, a). Antes que el segundo aminoacil-RNAt o cualquiera de los subsiguientes pueda enlazarse de manera eficaz al RNAm en el sitio A, debe combinarse con uno de los diversos **factores de alargamiento** de proteínas (este factor particular de alargamiento se denomina Tu en los procariotes y FAe1 en eucariotes) unido al GTP. Aunque cualquier complejo aminoacil-RNAt-Tu-GTP puede entrar al sitio A, sólo aquéllos cuyo anticodón sea complementario del codón RNAm situado en el sitio A puede quedar atrapado allí porque se une específicamente al RNAm. Una vez que el aminoacil-RNAt-Tu-GTP apropiado se enlaza al codón RNAm, el GTP se hidroliza y el complejo Tu-GDP se libera. El complejo RNAt-Tu-GTP se regenera, según se muestra en el paso 2 de la figura 11-49, a.

El segundo paso en el ciclo de alargamiento es la formación de un enlace peptídico entre los aminoácidos enlazados a los dos RNAt (paso 3, fig. 11-49, a, y fig. 11-49, b). La reacción ocurre por transferencia de la metionina (o de la N-formilmetionina) situada sobre el RNAt iniciador del sitio P al aminoácido unido al RNAt, unido a su vez al segundo codón en el sitio A. Esta reacción es catalizada por *peptidil transferasa*, un componente de la subunidad grande del ribosoma. Durante años, se asumió que la peptidil transferasa era una proteína del ribosoma. Después, conforme fue aparente la potencia catalítica del RNA, la atención se volvió al RNA ribosómico como catalizador para la formación de enlaces peptídicos. En la actualidad se ha demostrado que la actividad de la peptidil transferasa en realidad reside en la molécula del RNA ribosómico grande de la subunidad ribosómica grande. En otras palabras, la peptidil transferasa es una ribozima (estudiada en *La vía experimental* de la página 479).

La formación del primer enlace peptídico deja un extremo de la molécula de RNAt del sitio A todavía fijo a su codón complementario sobre el RNAm y el otro extremo de la molécula fijo a un dipéptido. El RNAt del sitio P queda entonces desprovisto de todo aminoácido unido. El tercer paso en el ciclo de alargamiento implica: 1) expulsión del RNAt no cargado del sitio P, y 2) movimiento del ribosoma trinucleótido (un codón) junto con el RNAm en la dirección 3' (paso 4, fig. 11-49, a). Este último paso, llamado **translocación**, se acompaña de movimiento del RNAt dipéptido hacia el sitio P del ribosoma, todavía enlazado mediante un puente de hidrógeno al segundo codón del RNAm. La translocación requiere otro factor de alargamiento (G en procariotes y FAe2 en eucariotes) y la hidrólisis de GTP. Puesto que la translocación implica el movimiento de una partícula sobre una distancia aproximada de 1 nm a lo largo del mensaje, debe acompañarse de notables cambios de conformación en la estructura del ribosoma. La energía requerida para impulsar la translocación es suministrada por la hidrólisis del GTP. Así, por cada ciclo de alargamiento cuando menos se hidrolizan dos moléculas de GTP, una (o más) durante la selección del aminoacil-RNAt y otra durante la translocación.

Una vez separado el peptidil-RNAt del sitio P, el sitio A una vez más se encuentra abierto a la entrada de otro aminoacil-RNAt, en este caso uno cuyo anticodón sea com-



(b)

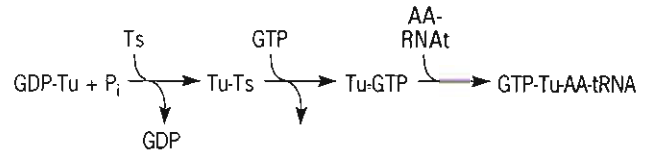


FIGURA 11-49. Pasos en el alargamiento del polipéptido naciente durante la traducción en procariotes. a) En el paso 1, un aminoacil-RNAt cuyo anticodón es complementario al segundo codón del RNAm entra al sitio vacío A del ribosoma. En el paso 2 el enlace del RNAt se acompaña de la liberación de GDP-Tu, que será reciclado según se muestra. En el paso 3 tiene lugar la formación de un enlace peptídico mediante la transferencia de la cadena del polipéptido naciente desde el RNAt en el sitio P al aminoacil-RNAt del sitio A. La reacción es catalizada por una porción del RNAr 28S que actúa como ribozima. En el paso 4, el enlace del factor G (FA-G) y la hidrólisis de GTP dan como resultado la liberación del RNAt del sitio P y la translocación del ribosoma relacionado con el RNAm. b) Formación de un enlace peptídico y desplazamiento subsecuente del RNAt desaminoado del sitio P.

plementario del tercer codón. Cuando el tercer RNAt cargado se asocia al RNAm en el sitio A, el dipéptido del RNAt del sitio P se transfiere al aminoácido sobre el RNAt del sitio A formando el segundo enlace peptídico y un tripéptido fijo al RNAt del sitio A. El RNAt del sitio P otra vez se encuentra desprovisto de un aminoácido. La formación de enlaces peptídicos va seguida de la expulsión del RNAt del sitio P y la translocación del ribosoma al cuarto codón, y el ciclo está listo para comenzar una vez más.

Precisión de la traducción

La interacción entre los tripletos del RNAm y el RNAt no ocurre con la suficiente fuerza para explicar por sí misma la precisión conocida de la síntesis de proteínas (sólo uno de cada 10 000 aminoácidos se incorpora de manera incorrecta). Se han propuesto diferentes hipótesis para explicar esta tasa relativamente baja de errores. Una hipótesis sugiere que sólo codones y anticodones complementarios entre sí pueden adaptarse dentro de la hendidura formada por el

RNA ribosómico, y sólo cuando la hendidura está ocupada puede formarse la unión peptídica. En otra hipótesis se da importancia al retraso aparente entre el enlace del complejo RNAt-Tu-GTP con el RNAm y el momento en que el aminoácido se añade a la cadena de polipéptido en crecimiento. Cuanto mayor sea el tiempo que un codón y un anticodón inapropiados (no complementarios) permanezcan enlazados, mayor será la probabilidad de que su débil interacción provoque la disociación y separación de los dos RNA. Otra hipótesis invoca la hidrólisis del GTP como medio para garantizar la fidelidad de la traducción. Aunque desde hace mucho se ha asumido que cada ciclo de alargamiento se acompaña de la hidrólisis de dos GTP, hay suficientes datos que sugieren que el verdadero número es de tres o más. La energía adicional puede ser consumida para liberar los RNAt enlazados de manera inadecuada.

La estreptomicina, uno de los antibióticos más ampliamente prescritos, ejerce su efecto porque se enlaza selectivamente a la subunidad ribosómica pequeña de las células bacterianas causando que ciertos codones del RNAm se lean de manera equivocada e incrementando, por lo tanto, la síntesis de proteínas anormales. Puesto que el antibiótico no se enlaza a ribosomas eucariotas, no tiene efectos sobre la traducción de los RNAm de las células del huésped. Así, la estreptomicina al parecer actúa enlazándose a la proteína ribosómica llamada S12, que de alguna manera participa en el control de la interacción precisa entre el RNAt específico

y el complejo ribosoma-RNAm. La resistencia bacteriana a la estreptomicina se puede atribuir a cambios en las proteínas ribosómicas, en particular S12. Una gran variedad de antibióticos deben su efecto a la interferencia con diferentes aspectos de la síntesis de proteínas en células bacterianas. En el cuadro 11-2 se presenta un resumen de la acción de algunos de estos antibióticos.

Terminación

Como se mencionó en la página 467, tres de los 64 codones trinucleótidos posibles son **codones de paro** cuya función es concluir el ensamblado de polipéptidos en vez de codificar otro aminoácido. No existe RNAt cuyos anticodones sean complementarios de los codones de paro. Cuando el ribosoma alcanza uno de estos codones, UAA, UAG, UGA, la señal que se lee es detener todo alargamiento adicional y liberar el polipéptido asociado al último RNAt. La terminación requiere la presencia de **factores de liberación** que interactúan directamente con los codones de paro; las bacterias tienen dos factores de liberación (FL1 reconoce UAA y UAG, y FL2 reconoce UGA), en tanto que las células eucariotas sólo poseen uno (FLe). El factor de liberación posee un GTP enlazado que posteriormente se hidroliza. Una vez detenida la traducción, el polipéptido terminado se separa de su fijación al RNAt, y ambos, factor de liberación y RNAt

CUADRO 11-2. Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas

Antibiótico	Sitio de acción				Efectos específicos
	Tipo de célula	Subunidad	Etapas	Alterado en mutantes resistentes	
Puromicina	Eu, Pro*	L	R, P	—	Libera peptidil-puromicina
Tetraciclinas	Pro	S	R	—	Bloqueo estable del enlace en el sitio A
Estreptomicina	Pro	S	I, R	Proteína S12	1. Irreversible: bloquea el movimiento del complejo de inicio 2. Causa lectura errónea por alargamiento del ribosoma
Kasugamicina	Pro	S	I	Proteína S2; RNA 16S	Bloquea la formación del complejo de inicio
Espectinomicina	Pro	S	I	Proteína S5	Bloquea el movimiento después del inicio
Cloranfenicol, lincomicina	Pro	L	P	—	Bloquea la transferencia de peptidil
Esparsomicina	Eu, Pro	L	P	—	Bloquea la reacción de puromicina y el enlace establece en el sitio A
Eritromicina	Pro	L	P	RNA 23S, Proteínas L4, L26	Bloquea la extensión de la cadena poco después del inicio
Siomicina, tiostrepton	Pro	L	T, R	RNA 23S	Irreversible; bloquea la unión de G-GTP, y de Tu-aa-RNAt-GTP
Kirromicina	Pro	S	R	Tu	Bloquea la liberación de Tu-GDP
Pulvomicina	Pro	S	R	—	Bloquea la formación de aa-RNAt-Tu-GTP
Acido fusídico	Eu, Pro	L	T	G	Bloquea la liberación de G y de GDP
Viomicina	Pro	S, L	T	S, L	Bloquea el sitio P

* Eu, pro = eucariote, células procariotas; L, S = subunidad ribosómica grande y pequeña; R = reconocimiento; P = transferencia de peptidil; T = translocación; I = inicio.

FUENTE: B.D. Davis, R. Dulbecco, H.N. Eisen y H.S. Ginsberg, *Microbiology*, 5a. ed., Lippincott, 1990, p. 211.

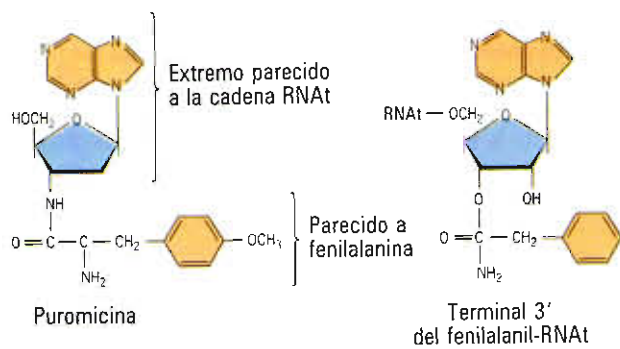


FIGURA 11-50. Semejanza entre puromicina y la terminal 3' de fenilalanil-RNAt. Debido a esta similitud, la puromicina entra al sitio A y provoca la liberación prematura del polipéptido naciente.

desacilado, se liberan del ribosoma. La hidrólisis del enlace entre el polipéptido y el último RNAt puede ser catalizada por la misma porción del RNAr encargada de la formación de enlaces peptídicos durante el alargamiento. Cuando la terminación concluye, el ribosoma se separa del mensaje y

se disocia en sus subunidades como preparación para otro turno de traducción.

Puesto que los tres codones de terminación pueden formarse con facilidad mediante cambios en una sola base a partir de muchos otros codones, podrían esperarse mutaciones que originen codones de paro *dentro* de un gen. Tales mutaciones provocarían la terminación prematura de la cadena de polipéptidos en crecimiento. Durante decenios se han estudiado mutaciones de este tipo, llamadas **mutaciones sin sentido**, y se sabe que provocan varias enfermedades hereditarias en el hombre. Las mutaciones sin sentido de ordinario ocasionan las formas más graves de una enfermedad hereditaria debido a que sólo se sintetiza una parte de la proteína y, por lo tanto, invariablemente es no funcional. Otra forma de terminar prematuramente el crecimiento de la cadena es añadir el antibiótico puromicina. Esta molécula se parece al extremo 3' de un RNAt cargado (fig. 11-50) y puede penetrar al sitio A del ribosoma. Una vez en dicho sitio, el péptido del sitio P se transfiere a la puromicina del sitio A y se forma un enlace covalente. La transferencia de la cadena naciente de polipéptido a la puromicina coloca un casquete sobre el extremo carboxilo de la cadena, de modo que ya no pueden fijarse más aminoácidos. En vez de ello, el complejo peptidil-puromicina separa al ribosoma.

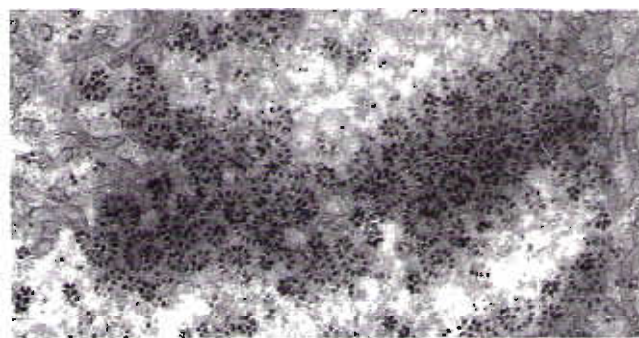
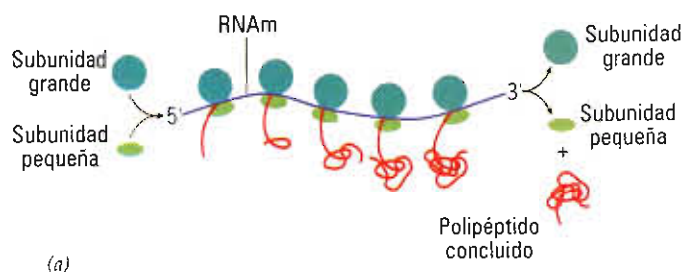


FIGURA 11-51 Polirribosomas. *a)* Dibujo esquemático de un polirribosoma (polisoma). *b)* Micrografía electrónica de un corte transversal a ras del borde exterior de una cisterna de retículo endoplásmico rugoso. Los ribosomas están alineados en asas y espirales, lo que indica su fijación a la molécula de RNAm para formar polisomas. *c)* Micrografía electrónica de polisomas con sombreado metálico y aislados de reticulocitos que participan en la síntesis de hemoglobina. La mayor parte de estos polisomas tienen entre cuatro y seis ribosomas. (*b*: Cortesía de E. Yamada; *c*: cortesía de Alexander Rich.)



Formación de polirribosomas

Cuando se examina en el microscopio electrónico un RNA mensajero durante el proceso de traducción, invariablemente se observan numerosos ribosomas fijos a todo lo largo de la cadena de RNAm. A este complejo de ribosomas y RNAm se le denomina **polirribosoma**, o **polisoma** (fig. 11-51). Inicialmente, cada uno de los ribosomas se ensambla a partir de sus subunidades en el codón de inicio y luego se desplaza desde ese punto hacia el extremo 3' del RNAm hasta alcanzar un codón de terminación. Tan pronto como cada ribosoma se desplaza una distancia suficiente a lo largo del mensaje a partir del codón inicial, el siguiente ribosoma se fija al RNAm y comienza la actividad de traducción. La traducción simultánea del mismo RNAm por un gran número de ribosomas incrementa mucho la tasa de síntesis de proteínas dentro de la célula.

Ahora que se han descrito los acontecimientos básicos de la traducción, es adecuado concluir el capítulo con foto-

grafías de este proceso, una tomada de una célula procariota (fig. 11-52, *a*) y la otra de una célula eucariota (fig. 11-52, *b*). A diferencia de las células eucariotas, en las cuales ocurre la transcripción en el núcleo y la traducción en el citoplasma y los dos procesos están separados por muchos pasos interpuestos, en las células procariotas las correspondientes actividades se encuentran firmemente acopladas. Por lo tanto, la síntesis proteínica en las células bacterianas se inicia sobre plantillas de RNAm mucho antes de concluir la síntesis del RNAm. La síntesis de un RNAm procede en la misma dirección que se mueven los ribosomas cuando traducen el mensaje, o sea, desde el extremo 5' al 3'. En consecuencia, tan pronto como una molécula de RNA comienza a sintetizarse, el extremo 5' está disponible para fijarse a ribosomas. La micrografía de la figura 11-52, *a*, muestra la cadena de DNA sobre la cual ocurre la transcripción, el RNAm de longitud creciente de un extremo al otro del gen, y los ribosomas fijos a cada RNAm naciente que forma los polirribosomas. En la micrografía de la figura

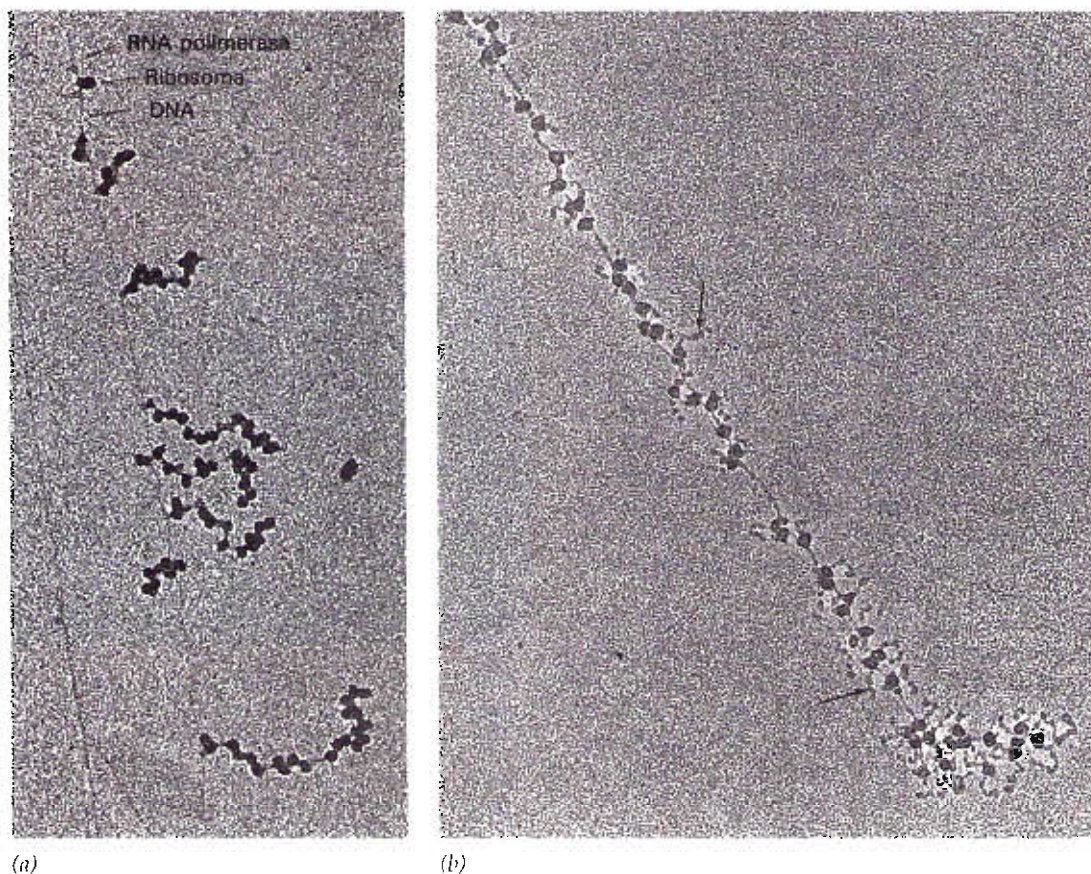


FIGURA 11-52. Observación visual de la transcripción y la traducción. *a*) Micrografía electrónica de partes de un cromosoma de *E. coli* que participa en la transcripción. El DNA se observa como líneas débiles que corren a lo largo de las fotos, en tanto que las cadenas de RNAm nacientes se observan fijas a uno de sus extremos, al parecer por una molécula de RNA polimerasa. Las partículas asociadas al RNA naciente son ribosomas en el acto de la traducción; en bacterias, la transcripción y la traducción ocurren simultáneamente. Las moléculas de RNA aumentan de longitud conforme crece la distancia al sitio de inicio. *b*) Micrografía electrónica de un polirribosoma aislado de las células de la glándula de la seda de un gusano de seda, las cuales producen grandes cantidades de la proteína fibroína de la seda. Esta proteína es lo bastante grande para ser visible en la micrografía (las flechas apuntan a las cadenas de polipéptido naciente). (*a*: Reimpreso con permiso de Oscar L. Miller, Jr., Barbara A. Hamkalo y C.A. Thomas, *Science* 169:392, 1970; copyright 1970 por American Association for the Advancement of Science; *b*: cortesía de Steven L. McKnight y Oscar L. Miller, Jr.)

11-52, *a*, no se observa la cadena nascente de proteína, pero puede verse en la micrografía de la figura 11-52, *b*, que muestra un solo polirribosoma aislado de una célula en la glándula secretoria de seda del gusano de seda. La proteína de la seda sintetizada es visible debido a su gran tamaño y naturaleza fibrosa. Las técnicas para visualizar la transcripción y la traducción desarrolladas por Oscar Miller, Jr., del Oak Ridge National Laboratory, suministran una demostra-

ción visual adecuada del proceso previamente descrito en términos bioquímicos.

Al iniciar este capítulo analizamos el cambiante concepto del gen. Se comenzó como una unidad hereditaria abstracta que gobierna las características de una planta de guisante, posteriormente el gen se convirtió en un sitio sobre un cromosoma, un segmento de una molécula de DNA, y más recientemente como unidad de transcripción. Es no-

LA VIA EXPERIMENTAL

Papel del RNA como catalizador

La investigación en bioquímica y biología molecular durante el decenio de 1970 consolidó nuestros conocimientos acerca del papel de las proteínas y los ácidos nucleicos. Las proteínas eran los agentes que ponen en marcha a la célula, las enzimas las que aceleran la velocidad de las reacciones químicas dentro de los organismos. Los ácidos nucleicos, por otra parte, constituían la molécula encargada de la información en la célula, almacenando instrucciones genéticas en sus secuencias de nucleótidos. La división del trabajo entre proteínas y enzimas parecía tan bien definida como cualquier definición establecida en las ciencias biológicas. Después, en 1981, se publicó un trabajo que comenzó a empañar esta distinción.¹

Thomas Cech y sus colaboradores, de la Universidad de Colorado, han estado estudiando el proceso mediante el cual el precursor de RNA ribosómico sintetizado por el protozoario ciliado *Tetrahymena thermophila* era convertido en moléculas de RNAr maduro. A diferencia del pre-RNAr de mamíferos estudiado en la página 447, *T. thermophila* pre-RNAr contiene una secuencia interpuesta de casi 400 nucleótidos seccionados del transcrito primario antes de unirse a los segmentos que deben juntarse (ligados).

Previamente, Cech había observado que los núcleos aislados de las células podían sintetizar el precursor pre-RNAr y efectuar la reacción de empalme en su totalidad. Todavía no se aislaban enzimas empalmadas de ningún tipo de célula y *Tetrahymena* podía ser un buen sistema para estudiar dichas enzimas. El primer paso fue aislar el precursor pre-RNAr en su estado intacto y luego determinar el número mínimo de componentes nucleares que debían añadirse a la mezcla de reacción para obtener un empalme preciso. Se observó que cuando se incuban núcleos aislados en un medio con cationes monovalentes en baja concentración (5 mM NH_4^+), se sintetiza la molécula pre-RNAr pero el intrón no se separa. Esto permitió a los investigadores purificar el precursor intacto que planeaban utilizar como sustrato para ensayar la actividad de empalme en extractos nucleares. Sin embargo, observaron que cuando se incubaba el precursor purificado por sí solo en concentraciones más elevadas de iones NH_4^+ en presencia de Mg^{2+}

y un compuesto de guanosina (p. ej., GMP o GTP), la secuencia interpuesta se desempalma del precursor (fig. VE 11-1).¹ El análisis de la secuencia de nucleótidos confirmó que el RNA pequeño separado del precursor era el intrón con un nucleótido añadido que contenía guanina en su extremo 5'. Se demostró que el nucleótido adicional se deriva del GTP añadido a la mezcla de reacción.



FIGURA VE 11-1. RNA ribosómico purificado procedente de *Tetrahymena* marcado con ^{32}P , transcrito a diferentes concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, que se analizó mediante gradiente de electroforesis en gel de poliacrilamida. Los números en la parte de arriba indican la concentración del sulfato de amonio. Se presentan dos grupos de muestras, "nativas" y desnaturalizadas por calor. Las muestras de este último grupo fueron hervidas durante cinco minutos en amortiguador y enfriadas sobre hielo para disociar toda molécula que pueda unirse mediante puentes de hidrógeno entre bases complementarias. Las dos columnas de la derecha contienen RNAr 16S y 23S bacteriano que proporcionan marcadores de tamaño conocido contra los cuales se pueden comparar otras bandas del gel. A partir de la posición de las bandas se puede observar que conforme se eleva la concentración de sulfato de amonio, aparece RNA pequeño cuyo tamaño es igual al de las secuencias interpuestas aisladas. Estos datos suministraron la primera indicación de que el RNAr tenía capacidad para seccionar al intrón sin ayuda de factores adicionales. (Según T.R. Cech y cols. Cell 27:488, 1981; con permiso de Cell Press.)

table que a través de todos estos cambios en el camino hacia el conocimiento de los factores hereditarios, cada idea acerca del gen retuvo su validez aunque se adaptó a los nuevos datos citológicos y moleculares. El descubrimiento de secuencias interpuestas cambió nuestro concepto una vez más, terminando con el dogma prevaleciente de que una secuencia lineal ininterrumpida de nucleótidos genera una secuencia correspondiente de aminoácidos, y reveló la inesperada complejidad de la transferencia de información dentro de la célula eucariota.

El empalme de un intrón es una reacción complicada que requiere reconocimiento de las secuencias que limitan el intrón, desdoblamiento de los enlaces fosfodiéster en ambos lados del intrón y unión de los fragmentos adyacentes. Se han efectuado todo tipo de esfuerzos para eliminar cualquier proteína que pudiera adherirse al RNA antes de probar su capacidad de empalme. El RNA se ha extraído con detergente-fenol, se ha centrifugado a través de un gradiente y se ha tratado con una enzima proteolítica. Sólo hubo dos explicaciones razonables: el empalme lo efectuaba una proteína enlazada firmemente al RNA o la molécula pre-RNAr era capaz de empalmarse por sí misma. Esta última idea no era fácil de aceptar.

Para resolver la cuestión de la presencia de una proteína contaminante, Cech y colaboradores utilizaron un sistema artificial en el cual era imposible la existencia de proteínas nucleares de empalme.² El DNA que codifica al precursor de RNAr fue desarrollado en *E. coli* mediante clonación del DNA, a continuación se purificó y utilizó como plantilla para la transcripción *in vitro* por una RNA polimerasa bacteriana purificada. El pre-RNAr sintetizado *in vitro* se purificó e incubó por sí solo en presencia de iones monovalentes y divalentes, y un compuesto de guanosina. Puesto que el RNA nunca había estado en una célula, era imposible que estuviera contaminado por enzimas celulares empalmadas. Aun así, el pre-RNAr aislado sufrió la reacción de empalme precisa que había ocurrido en la célula. El RNA tenía que haberse empalmado por sí solo.

Como resultado de estos experimentos, se demostró que el RNA era capaz de catalizar una reacción compleja de múltiples pasos. Los cálculos indicaron que la reacción se efectuó con una velocidad diez millones de veces mayor, aproximadamente, en comparación con la reacción no catalizada. Por lo tanto, igual que las enzimas de proteína, el RNA era activo en concentraciones pequeñas, no se alteraba por la reacción y pudo acelerar mucho una reacción química. La única diferencia entre este DNA y las "enzimas estándar" fue que el RNA actúa sobre sí mismo en vez de hacerlo sobre un sustrato independiente. Cech llamo "ribozima" al RNA.

En 1983 se descubrió un segundo ejemplo, aunque no relacionado, de catálisis de RNA.³ Sidney Altman y colaboradores, de la Universidad de Yale, y Norman Pace y colegas, del National Jewish Hospital en Denver, colaboraron en un estudio acerca de la ribonucleasa P, enzima que participa en el procesamiento de un precursor de RNA de transferencia en bacterias. La enzima era poco común por estar compuesta tanto de proteínas como de RNA. Cuando se incubó en amorti-

Como ocurre con frecuencia, el descubrimiento de nuevas circunstancias enigmáticas ayuda a explicar otras. En este caso, se comprobó que la mayor parte de los genes contienen un conjunto de intrones que en total corresponden a una longitud igual a varias veces la de los segmentos codificantes; esto fue un gran avance en el camino para explicar la existencia de demasiado DNA en los genomas de los organismos evolutivamente elevados y por qué los transcritos primarios son mucho más largos que los mensajeros producidos en último término.

guadores con una concentración elevada de Mg^{2+} (60 mM), la subunidad RNA purificada pudo eliminar el extremo 5' del precursor de RNAt (fila 7, fig. VE 11-2), así como la molécula íntegra de ribonucleasa P lo haría dentro de la célula. Se demostró que los productos de la reacción *in vitro* incluyen la molécula de RNAt madura procesada. En contraste, la subunidad de proteína aislada de la enzima estaba desprovista de actividad catalítica (fila 5, fig. VE 11-2).

Para eliminar la posibilidad de que una proteína contaminante fuera realmente la que catalizaba la reacción, se sintetizó *in vitro* la porción de RNA de la ribonucleasa P a partir de una

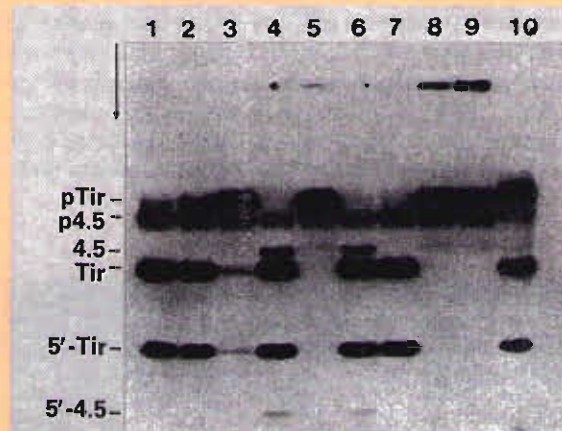


FIGURA VE 11-2. Resultados de la electroforesis en gel de poliacrilamida de la reacción entre mezclas que contienen el precursor de tirosinil-RNAt (pTir) y el precursor de otro RNA llamado RNA 4.5S (p4.5). Nos centraremos exclusivamente en pTir, normalmente procesado por la RNAasa P en dos moléculas de RNA, Tir y 5'-Tir (que corresponde al extremo 5', el precursor). Las posiciones a las cuales se desplazan estos tres RNA (pTir, Tir y 5'-Tir) durante la electroforesis se indican en el lado izquierdo del gel. La línea 1 muestra los RNA que aparecen en la mezcla de reacción cuando se incubó pTir (y p4.5) con la enzima RNAasa P completa. Muy poco del pTir permanece en la mezcla porque se convierte en los dos productos (Tir y 5'-Tir). La línea 5 muestra los RNA que aparecen en la mezcla de reacción cuando pTir se incubó con el componente proteínico purificado de la enzima. La proteína no tiene capacidad para desdoblar el precursor RNAt, según se manifiesta por la ausencia de bandas donde se desplazarían los dos productos. En contraste, cuando se incubó pTir con el componente RNA purificado de la enzima (línea 7), pTir se procesa de manera tan eficiente como si se empleara la RNAasa P intacta. (Según C. Guerrier-Tokada y cols. *Cell* 35:851, 1983; con permiso de Cell Press.)

plantilla de DNA recombinante. Igual que con el RNA extraído de células bacterianas, este RNA sintetizado artificialmente, sin proteína alguna añadida, pudo desdoblarse con precisión el precursor de RNAt.⁴ A diferencia de la enzima procesadora de RNAr estudiada por Cech, el RNA de la ribonucleasa P actuó sobre otra molécula como sustrato y no sobre sí misma. Por lo tanto, se demostró que las ribozimas pueden tener las mismas propiedades catalíticas de las enzimas proteináceas. En la figura VE 11-3 se muestra un modelo reciente de interacción entre la subunidad de RNA catalítica de la ribonucleasa P y un sustrato precursor de RNAt.

La demostración de que el RNA puede catalizar reacciones químicas generó la atmósfera apropiada para volver a investigar una antigua pregunta: qué componente de la subunidad ribosómica grande es la peptidiltransferasa, o sea, el catalizador de la formación de los enlaces peptídicos (pág. 474). En el decenio de 1970, varios hallazgos independientes plantearon la posibilidad de que el RNA ribosómico podía hacer algo más que actuar simplemente como un molde para sostener proteínas ribosómicas particulares en la posición apropiada de modo que las proteínas puedan efectuar importantes actividades. Entre las pruebas se incluyen los siguientes tipos de datos.

1. Ciertas cepas de *E. coli* portan genes que codifican proteínas que destruyen bacterias llamados colicinas. Se sabe que una de estas toxinas, llamada colicina E3, inhibe la síntesis de proteínas en células bacterianas sensibles. Los ribosomas aislados de células tratadas con colicina E3 parecen perfectamente normales según la mayor parte de los criterios, pero no apoyan la síntesis de proteínas *in vitro*. Un análisis más atento de dichos ribosomas reveló que el defecto reside en el RNAr, no en la proteína ribosó-

mica. El RNA 16S de la subunidad pequeña fue desdoblado por la colicina en casi 50 nucleótidos desde su extremo 3', y ésta es la causa de que la subunidad no apoyara la síntesis de proteínas.⁵

2. Se observó que el tratamiento de la subunidad ribosómica grande con ribonucleasa T₁, una enzima que desdobla los enlaces entre nucleótidos adyacentes del RNA, destruye la capacidad de la subunidad para efectuar la reacción de la peptidiltransferasa.⁶
3. Estudios muy variados con antibióticos que inhiben la formación del enlace peptídico, incluyendo cloranfenicol, carbomicina y eritromicina, sugieren que estos fármacos actúan sobre el RNA ribosómico y no sobre la proteína. Por ejemplo, se observó que los ribosomas se vuelven resistentes a los efectos del cloranfenicol como resultado de sustituciones en las bases del RNA ribosómico.⁷
4. Se ha demostrado que el RNA ribosómico se conserva con gran persistencia en la secuencia de bases, mucho más que la secuencia de aminoácidos de las proteínas ribosómicas. Algunas regiones del RNA ribosómico prácticamente son invariables en ribosomas aislados de bacterias (tanto arqueobacterias como eubacterias), hongos, plantas y animales, y también en ribosomas aislados de mitocondrias y cloroplastos. Casi todas las regiones persistentemente conservadas se proyectan en la superficie del ribosoma. El hecho de que la secuencia de RNAr esté tan conservada sugiere que estas moléculas tienen un papel crucial en la función del ribosoma.^{8,9} En realidad, una conclusión del trabajo de C.R. Woese y sus colaboradores, publicado en 1975,⁸ afirma: "Puesto que la correlación entre estas regiones conservadas y los sitios conocidos de unión ribosómica es escasa o no existe, hay una fuerte implicación de que las grandes áreas de RNA participan directamente en la función ribosómica."

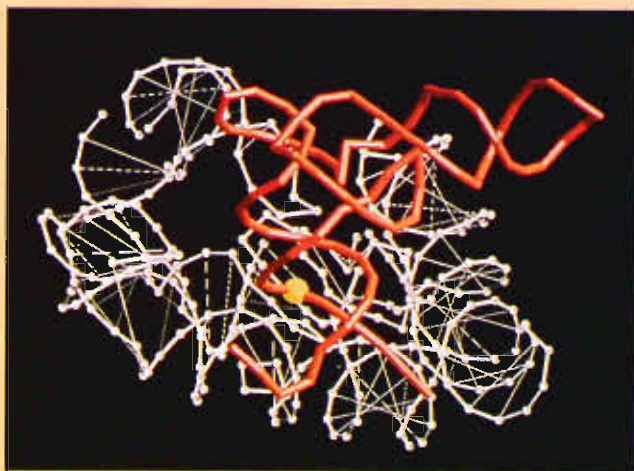


FIGURA VE 11-3. Modelo de la molécula de una porción de la subunidad de RNA catalítico de la ribonucleasa P bacteriana (blanco) y de su sustrato enlazado, RNAt precursor (rojo). El sitio sobre el RNAt precursor donde ocurre el desdoblamiento causado por la ribozima está indicado por una esfera amarilla. (Cortesía de Michael E. Harris y Norman R. Pace.)

Luego del descubrimiento del RNA catalítico en los laboratorios de Cech y Altman se intensificó la investigación sobre el papel del RNA ribosómico. Varios estudios efectuados por Harry Noller y sus colegas en la Universidad de California, en Santa Cruz, precisaron el sitio en el RNA ribosómico donde reside, o alrededor del cual se encuentra, el centro de la peptidiltransferasa. En un estudio, sintetizaron una versión modificada de fenilalanil-RNAt (fig. VE 11-4, a) que, cuando se enlaza al sitio P de un ribosoma, forma por sí solo un enlace cruzado con la molécula RNAr. Incluso en esta etapa de unión cruzada, el RNAt análogo retiene su capacidad de participar en la formación de enlaces peptídicos, dato que indica que el análogo debe estar situado en el sitio P con la orientación apropiada. Análisis subsecuentes del RNAr en estos experimentos indicaron que los nucleótidos con enlace cruzado en el RNAr se localizan en un sitio altamente conservado que forma una asa central localizada en el dominio V de la molécula (fig. VE 11-4, b).¹⁰ Esta es precisamente la misma región del RNAr que recientemente se señaló como sitio de mutaciones que confieren resistencia al cloranfenicol o a la eritromicina (fig. VE 11-4, b). En conjunto, estos datos señalan fuertemente a esta asa del RNA como componente integral del centro de la peptidiltransferasa. En otra serie de experimen-

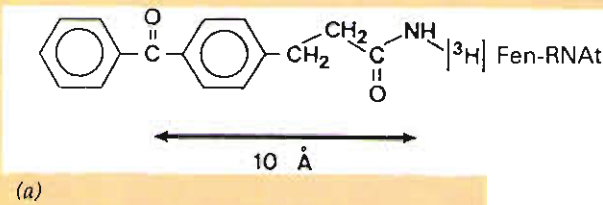
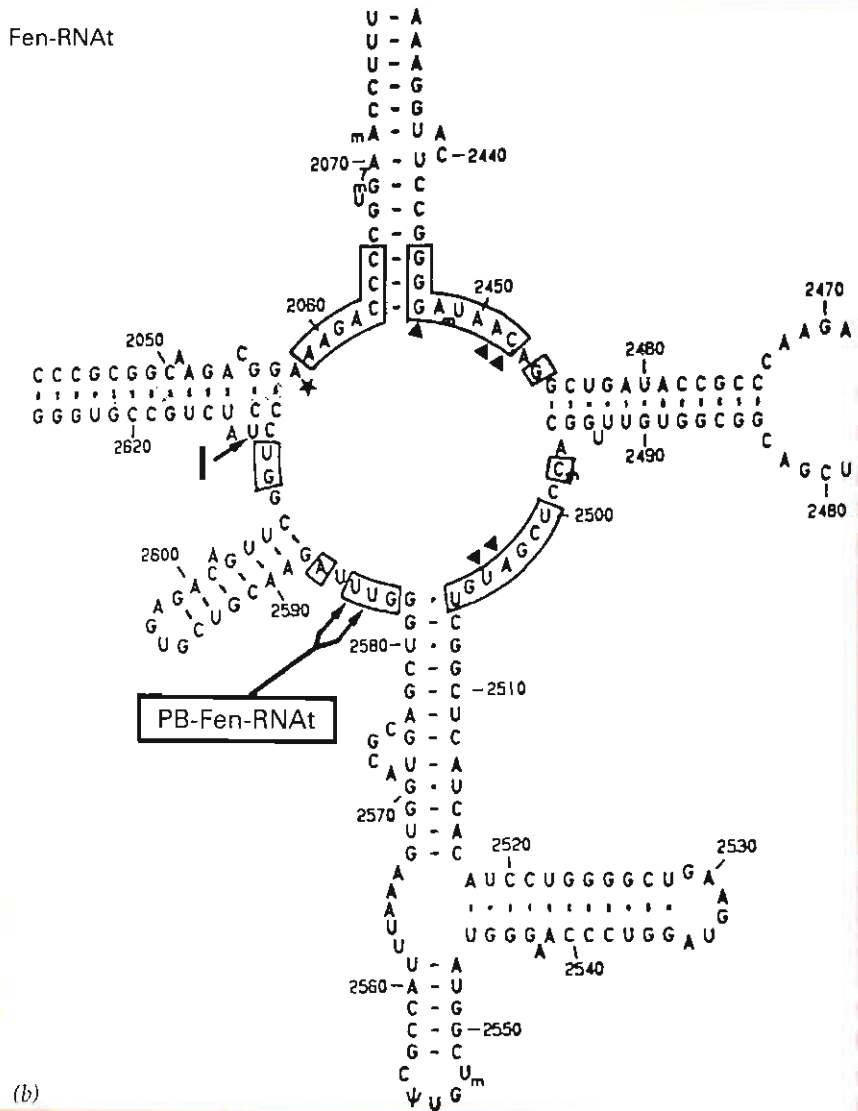


FIGURA VE 11-4. a) Estructura de la fenilalanil-RNAt modificada que se emplea en los experimentos. b) Estructura secundaria del dominio V del RNAr 23S bacteriano. Los residuos U en los sitios 2584 y 2585 están marcados por fotoafinidad para el RNAt análogo mostrado en a en el sitio ribosómico P. Las secuencias en cuadro son altamente conservadas a través de la evolución; también se muestran sitios donde hay cambio de bases como resultado de la resistencia a cloranfenicol (triángulo sólido) y eritromicina (asterisco). (Según A. Barta y cols. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:3607-3610, 1984.)



tos se demostró que el RNA de transferencia enlazado al ribosoma protege bases específicas en el RNAr de la subunidad grande contra el ataque de agentes químicos específicos. La protección contra ataques químicos indica que el RNAt debe estar situado muy cerca de las bases RNAr protegidas. Diferentes grupos de bases son protegidos dependiendo de que el RNAt se enlace al sitio A o al P, pero en cualquier caso los nucleótidos protegidos se sitúan dentro del asa central del dominio V, o alrededor de ésta.¹¹ La protección se pierde si el extremo 3' del RNAt (el extremo con el CCA enlazado al aminoácido) se elimina. Este es el extremo del RNAt implicado en la formación del enlace peptídico, el cual sería de esperar que residiera en estrecha proximidad al sitio de la peptidil-transferasa.

Los intentos para asignar una función particular al RNA ribosómico *aislado* siempre han fracasado. Se considera que aun si la *proteína* ribosómica no tiene función específica, su presencia cuando menos es necesaria para mantener el RNAr en su conformación apropiada. Considerando que las proteínas ribosómicas y el RNAr evolucionaron conjuntamente durante cientos de millones de años, sería de esperar que las moléculas fueran interdependientes. A pesar de esta expectativa, en 1992 Harry Noller y sus colaboradores finalmente demostraron la potencia catalítica del RNAr aislado.¹² Trabajando con ribosomas particularmente estables de *Thermus aquaticus*, una bacteria que vive a temperaturas elevadas, Noller trató preparaciones de la subunidad ribosómica grande con un detergente extractor de proteína (DSS), una enzima que degrada

proteínas (proteína K) y varios pasos en fenol desnaturizador de proteínas. En conjunto, estos agentes eliminaron cuando menos 95% de la proteína de la subunidad ribosómica dejando nada más RNAr. Se demostró que más de 5% de la proteína que permaneció asociada al RNAr constaba de péptidos pequeños, que eran fragmentos de las proteínas ribosómicas. Pero a pesar de eliminar casi toda la proteína, el RNAr retuvo 80% de la actividad peptidiltransferasa de la subunidad intacta. La actividad catalítica fue bloqueada por cloranfenicol y por el tratamiento con ribonucleasa. Cuando se sometió el RNA a tratamientos adicionales para eliminar la pequeña cantidad de proteína restante, la preparación perdió su actividad catalítica. Puesto que es muy poco probable que los fragmentos restantes de proteína sean lo bastante grandes para mostrar cualquier actividad catalítica importante, hay acuerdo general de que estos experimentos demostraron que la peptidiltransferasa es una ribozima.

BIBLIOGRAFIA

1. Cech, T.R., Zaug, A.J. y Grabowski, P.J. 1981. In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*. *Cell* 27:487-496.
2. Kruger, K. y cols. 1982. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* 31:147-157.
3. Guerrier-Tokada, C. y cols. 1983. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35:849-857.
4. Guerrier-Tokada, C. y cols. 1984. Catalytic activity of an RNA molecule prepared by transcription in vitro. *Science* 223:285-286.
5. Bowman, C.M. y cols. 1971. Specific inactivation of 16S ribosomal RNA produced by colicin E3 in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68:964-968.
6. Cerna, J., Rychlick, I. y Jonak, J. 1975. Peptidyl transferase activity of *Escherichia coli* ribosomes digested by ribonuclease T₁. *Eur. J. Biochem.* 34:551-556.
7. Kearsey, S. y Craig, I.W. 1981. Altered ribosomal RNA genes in mitochondria from mammalian cells with chloramphenicol resistance. *Nature* 290:607-608.
8. Woese, C.R. y cols. 1975. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature* 254:83-86.
9. Noller, H.F. y Woese, C.R. 1981. *Science* 212:403.
10. Barta, A. y cols. 1984. Identification of a site on 23S ribosomal RNA located at the peptidyl transferase center. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:3607-3611.
11. Moazed, D. y Noller, H.F. 1989. Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites. *Cell* 57:585-597.
12. Noller, H.F., Hoffarth, V. y Zimniak, L. 1992. Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* 256:1416-1419.

SINOPSIS

Nuestro conocimiento de la relación entre genes y proteínas es resultado de algunas observaciones clave. La primera observación importante fue efectuada por Garrod, quien concluyó que las personas que sufren enfermedades metabólicas hereditarias carecen de enzimas específicas. Más tarde, Beadle y Tatum pudieron inducir mutaciones en los genes de *Neurospora* e identificar la reacción metabólica específica afectada. Estos estudios condujeron al concepto de "un gen-una enzima" y posteriormente a la versión más refinada de "un gen-una cadena de polipéptidos". Las consecuencias moleculares de una mutación fueron descritas por primera vez por Ingram, quien demostró que la anemia drepanocítica, una enfermedad hereditaria, se debe a la sustitución de un solo aminoácido en una cadena de globina (p. 434).

El primer paso en la expresión de un gen es la transcripción de una cadena de la plantilla de DNA por una RNA polimerasa. Las moléculas de polimerasa se dirigen al sitio apropiado sobre el DNA al enlazarse a una región promotora, que en casi todos los casos se sitúa justamente por delante del sitio en el cual se inicia la transcripción. La polimerasa se desplaza en la dirección 3' a 5' a lo largo de la cadena de DNA que sirve como plantilla, que se ensambla a una cadena complementaria antiparalela de RNA que crece desde su extremo terminal 5' en dirección 3'. A cada paso a lo largo de la vía, la enzima cataliza una reacción en la cual se hidrolizan trifosfatos de ribonucleósido (NTP) para convertirse en monofosfatos de nucleósido conforme son incorporados. La reacción también es controlada por hidrólisis del pirofosfato liberado. Los pro-

cariotes poseen un solo tipo de RNA polimerasa que puede asociarse a varios factores sigma diferentes que determinan cuáles genes se transcriben. El sitio donde se inicia la transcripción es determinado por una secuencia de nucleótidos localizada aproximadamente 10 bases adelante del sitio de inicio (p. 437).

Las células eucariotas tienen tres RNA polimerasas distintas (I, II y III), cada una encargada de la síntesis de grupo diferente de RNA. Casi 80% del RNA de la célula consta de RNA ribosómico (RNAr). Los RNA ribosómicos (con excepción de la especie 5S) son sintetizados por RNA polimerasa I; transfieren RNA mediante la RNA polimerasa III; y el RNAm por la RNA polimerasa II. Los tres tipos de RNA se derivan de transcritos primarios que son más largos que el producto RNA final. El procesamiento de RNA requiere varios RNA nucleares pequeños (RNAnp) (p. 441).

Tres de los cuatro RNAr eucariotas (5.8S, 18S y 28S) se sintetizan a partir de una sola unidad de transcripción, constituida por DNA (DNAr) localizada dentro del nucléolo, y se procesa mediante una serie de reacciones nucleolares. Los nucléolos de oocitos de anfibios se pueden dispersar para revelar activamente el DNAr transcrito que toma la forma de una cadena de "árboles de Navidad". Cada uno de los árboles es una unidad de transcripción cuyas ramas más pequeñas representan a los RNA más cortos que se encuentran en la etapa más temprana de transcripción, o sea, más próximos al sitio donde se inició la síntesis de RNA. El análisis de estos

complejos revela la disposición en serie de los genes RNAr, la presencia de espaciadores no transcritos que separan las unidades de transcripción y la presencia de partículas de ribonucleoproteínas acompañantes (RNP) implicadas en el procesamiento de los transcritos. Los pasos que ocurren en el procesamiento del RNAr fueron estudiados al exponer células de mamífero cultivadas a precursores marcados, como ^{14}C -metionina, cuyos grupos metilo se transfirieron a algunos nucleótidos del pre-RNAr. Se cree que la presencia de los grupos metilo protege ciertos sitios del RNA a partir del desdoblamiento por nucleasas implicadas en el procesamiento del transcrito. Casi la mitad de los transcritos primarios 45S se eliminan durante la formación de los tres productos RNAr maduros. El nucléolo también es sitio de ensamblado de las subunidades ribosómicas (p. 443).

Los precursores del RNAr 5S y del RNAt son sintetizados por la RNA polimerasa III, cuyo promotor se localiza en la porción transcrita del gen en vez de la región que lo flanquea hacia arriba. Ambos tipos de RNA se sintetizan en tramos de DNA en los cuales los genes están organizados en serie, con las porciones transcritas alternando con espaciadores no transcritos. Luego de su procesamiento, los RNAr 5S son transportados al nucléolo donde son ensamblados con otros componentes en la subunidad ribosómica grande. Los genes de RNA de transferencia se localizan en grupos que contienen múltiples copias de diferentes genes (p. 447).

Estudios de cinética de RNA rápidamente marcado sugieren que el RNAm se deriva de precursores mucho mayores. Cuando se incuban células eucariotas de uno a pocos minutos en ^3H -uridina u otros precursores de RNA marcados, la mayor parte de la marca se incorpora al grupo de moléculas RNA de peso molecular muy elevado y diversas secuencias de nucleótidos, y se restringen al núcleo. Estos RNA se conocen como RNA nuclear heterogéneo (o RNAnh). Cuando las células incubadas brevemente con ^3H -uridina se siguen en un medio que contenga precursores no marcados durante una hora o más, la radiactividad aparece en el RNAm citoplásmico más pequeño. Este y otros datos, como la presencia de casquete 5' y apéndice poli(A) 3' en ambos RNAnh y RNAm, llevó a la conclusión de que el RNAnh es el precursor del RNAm (p. 448).

Los pre-RNAm son sintetizados por acción de moléculas de RNA polimerasa II junto con algunos factores de transcripción general que permiten a la polimerasa reconocer el sitio del DNA apropiado e iniciar la transcripción en el nucleótido apropiado. En casi todos los genes estudiados, el promotor se sitúa entre las bases 24 y 32 adelante del sitio de inicio en una región que contiene el segmento TATA. Este segmento TATA es identificado por la proteína de enlace TATA (PET), cuyo enlace al DNA inicia el ensamblado de un complejo de preinicio. La fosforilación de una parte de la RNA polimerasa provoca la separación de la polimerasa y el inicio de la transcripción (p. 449).

Una de las revisiones más importantes en nuestro concepto de gen tuvo lugar a fines del decenio de 1970 con el descubrimiento de que las regiones codificantes de un gen no forman

una secuencia continua de nucleótidos. Las primeras observaciones a este respecto fueron efectuadas en estudios de transcripción del genoma de un adenovirus, en el cual se observó que la porción terminal de algunos RNA mensajeros diferentes se componen de la misma secuencia de nucleótidos codificados por segmentos discontinuos en el DNA. Las regiones situadas entre los segmentos codificantes se denominan secuencias interpuestas. Pronto se observó una condición similar para los genes celulares, como los que codifican globina β y ovalbúmina. En cada caso, las regiones de DNA que codifican porciones del polipéptido (exones) están separadas entre sí por regiones no codificantes (intrones). Un análisis subsecuente indicó que todo el gen se transcribe a un transcrito primario. Las regiones correspondientes a los intrones son eliminadas posteriormente del pre-RNA y se le unen los segmentos codificantes adyacentes. Este proceso de separación y reunión se denomina empalmado del RNA (p. 451).

Los principales pasos en el procesamiento de los transcritos primarios para convertirlos a RNAm incluyen adición de un casquete 5', formación de un extremo 3', adición de un apéndice poli(A) 3' y eliminar las secuencias interpuestas. La formación del casquete 5' ocurre mediante una reacción por pasos en la cual se extrae el fosfato terminal, se añade GMP en orientación inversa, y se agregan grupos metilo a la guanosina añadida y al primer nucleótido del propio transcrito. El extremo 3' final del RNAm se genera por desdoblamiento del transcrito primario justo en el sitio situado por debajo de un punto de reconocimiento AAUAAA y la adición de residuos de adenosina, uno a la vez, mediante la polimerasa poli(A). La eliminación de los intrones del transcrito primario depende de la presencia de residuos invariables en ambos sitios de empalme 5' y 3' sobre cualquier lado de cada intrón. El empalme se efectúa por un espliceosoma multicomponente que contiene varias proteínas y partículas de ribonucleoproteínas (RNPnp) que se ensamblan de manera gradual en el sitio donde se retira el intrón. El conocimiento de la evolución de los mecanismos de empalme se obtuvo a partir de estudios de reacciones de autodesdoblamiento de los intrones del grupo I y el grupo II de RNA en eucariotes inferiores, mitocondrias y cloroplastos. Estos estudios sugieren fuertemente que los RNPnp del espliceosoma, no las proteínas, son los componentes catalíticamente activos de los RNPnp. Uno de los beneficios aparentes del desdoblamiento de genes es la facilidad con la cual se pueden barajar los exones dentro del genoma y generar nuevos genes a partir de secciones de otros genes preexistentes (p. 455).

La información para la incorporación de aminoácidos a un polipéptido está codificada en la secuencia de tripletos de codones en el RNAm. Además de encontrarse en el tripleto, el código genético no es un código superpuesto y está deteriorado. En un código no superpuesto, cada nucleótido es parte de uno y sólo de un codón, y el ribosoma debe desplazarse a lo largo del mensaje, tres nucleótidos cada vez. Para asegurar la lectura de los tripletos apropiados, el ribosoma se fija al RNAm en el sitio preciso denominado codón de inicio, AUG, que automáticamente coloca al ribosoma en el cuadro de lectura apropiado de modo que lea correctamente todo el mensaje. Un código tripleto formado por cuatro diferentes nucleótidos puede tener 64 (4^3) codones diferentes. El código está

deteriorado debido a que muchos de los 20 aminoácidos tienen más de un codón. De los 64 codones posibles, 61 especifican un aminoácido, en tanto que los otros tres son codones para detener el proceso y provocan que el ribosoma concluya la traducción. Las funciones asignadas a los codones son prácticamente las mismas en toda célula y sus secuencias son tales que la sustitución de bases en el RNAm tiende a reducir al mínimo el efecto sobre las propiedades del polipéptido (p. 465).

La información contenida en el alfabeto de nucleótidos del DNA y el RNA es descodificada por el RNA de transferencia durante el proceso de traducción. Los RNA de transferencia son RNA pequeños (73 a 93 nucleótidos de largo) que comparten una estructura tridimensional similar en forma de L y algunos residuos invariables. Un extremo del RNAt posee el aminoácido y el otro extremo contiene una secuencia anticodón de tres nucleótidos complementaria del tripleto de codón del RNAm. Los requerimientos estéricos de complementariedad entre codón y anticodón son menos estrictos en la tercera posición del codón para permitir que diferentes codones que especifican el mismo aminoácido utilicen el mismo RNAt. Es indispensable que cada RNAt se una al aminoácido apropiado (conocido), o sea, el aminoácido especificado por el codón RNAm al cual se une el anticodón RNAt. El enlace de los RNAt con sus aminoácidos conocidos está garantizado por un grupo diverso de enzimas denominadas aminoacil-RNAt sintetasas. Cada enzima es específica para uno de los 20 aminoácidos y puede reconocer todos los RNAt a los cuales cada aminoácido debe unirse. El consumo de energía durante la formación de los aminoacil-RNAt es el paso primario que requiere energía en todo el proceso de ensamblado de polipéptidos (p. 468).

La síntesis de proteínas es la actividad sintética más compleja que ocurre dentro de una célula, e implica todos los diferentes RNAt con los aminoácidos a los cuales se unen los ribosomas, el RNA mensajero, algunas proteínas, los cationes y GTP. El proceso se divide en tres actividades: inicio, alargamiento y terminación. Las actividades principales de inicio incluyen la unión precisa de la subunidad ribosómica pequeña al codón de inicio del RNAm, que establece el marco de lectura para todo el proceso de traducción; la entrada al ribosoma de un RNAt^{Met} especial de inicio, y el ensamblado del mecanismo de traducción. Durante el alargamiento ocurre un ciclo de entrada del RNAt, formación de enlace peptídico y salida del RNAt autorrepetido con cada aminoácido incorporado. El aminoacil-RNAt penetra a través del sitio A, donde se une al codón complementario del RNAm. Conforme penetra cada RNAt, el polipéptido naciente fijo al RNAt del sitio P es transferido al aminoácido sobre el RNAt del sitio A, formando una unión peptídica. La formación de uniones peptídicas es catalizada por una porción del RNAr grande que actúa como ribozima. A continuación el RNAt no cargado del sitio P es expulsado y el ribosoma se transloca al siguiente codón del RNAm, listo para repetir el ciclo. Tanto el inicio como el alargamiento requieren hidrólisis de GTP, que se cree que sirve principalmente para incrementar la precisión de la traducción. La traducción termina cuando el ribosoma alcanza uno de los tres codones de paro. Luego que un ribosoma se ensambla en el codón de inicio y se desplaza una corta distancia hacia el extremo 3' del RNAm, generalmente otro ribosoma se fija al codón de inicio, de modo que cada RNAm es traducido simultáneamente por varios ribosomas, lo que incrementa mucho la tasa de síntesis de proteína dentro de la célula. El complejo formado por un RNAm y sus ribosomas acompañantes constituyen un polirribosoma (p. 471).

PREGUNTAS DE REPASO

1. ¿Por qué razón Beadle y Tatum concluyeron que un gen codifica una enzima específica?
2. ¿Cómo pudo Ingram determinar el aminoácido sustituido en la hemoglobina de personas con anemia drepanocítica sin secuenciar la proteína?
3. ¿Cuál es el papel de un promotor en la expresión de genes? ¿Dónde se localizan los promotores para diferentes polimerasas procariotas y eucariotas?
4. Describir la diferencia entre un transcrito primario, una unidad de transcripción, un RNAm maduro y un intermedio de procesamiento.
5. Dibujar un esquema de una micrografía electrónica de DNAr que esté siendo transcrito. Marcar el espaciador no transcrito, el espaciador transcrito, las moléculas de RNA polimerasa, el RNP_{U3} y el promotor.
6. Comparar la organización de los genes que codifican RNAr grandes y RNA 5S, y el RNAt dentro del genoma de un vertebrado.
7. ¿Qué es la separación de un gen? ¿Cómo se descubrió el rompimiento de genes?
8. ¿Cuál es la relación entre RNAn_h y RNAm? ¿Cómo se descubrió esta relación?
9. ¿Cuáles son los pasos generales en el procesamiento de un pre-RNAm a un RNAm? ¿Cuál es el papel de los RNAn_p y del espliceosoma?
10. ¿Qué significa el término "mundo de RNA"? ¿Qué tipo de pruebas argumentan en favor de su existencia?
11. Explicar qué significa la expresión: el código genético es tripleto y no superpuesto. ¿Qué sugiere el dato de que la composición de bases del DNA varía mucho entre diferentes organismos en relación con el código genético? ¿Cómo se estableció la identidad del codón UUU?
12. ¿Por qué se conocen los RNAt como moléculas adaptadoras? ¿Qué aspecto estructural tienen en común los RNAt?
13. Describir la naturaleza de la interacción entre RNAt y aminoacil-RNAt sintetasas. Describir la naturaleza de la interacción entre RNAt y RNAm. ¿Qué significa la hipótesis de la flexibilidad de la interacción?
14. Describir algunas diferencias entre los pasos de inicio de la traducción y los pasos de alargamiento de la misma.
15. ¿Qué es un polirribosoma? ¿En qué difiere su formación en procariotes y eucariotes?

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. ¿Qué codones esperaría usted que tengan un RNAt único, o sea, uno que sólo se emplea para ese codón? ¿Por qué muchos codones no tienen su propio RNAt único?
2. La proflavina es un compuesto que se autointroduce en el DNA y provoca mutaciones que cambian los cuadros de lectura. ¿En qué difiere el efecto de las mutaciones inducidas por proflavina en la secuencia de aminoácidos de un código superpuesto y de otro no superpuesto?
3. Se acaba de aislar un nuevo fármaco que sólo tiene un efecto claro sobre el metabolismo celular: inhibe totalmente el desdoblamiento de pre-RNAr a RNA ribosómico. Luego de tratar un cultivo de células con este fármaco, se suministra a las células ^3H -uridina durante dos minutos y luego se les deja crecer durante cuatro horas en presencia del fármaco en un medio no marcado antes de extraer el RNA y centrifugarlo a través de un gradiente de sucrosa. Dibujar las curvas que se obtienen graficando absorbancia a 260 nm y radiactividad contra número de fracciones del gradiente. En la abscisa, utilizar valores S de RNA.
4. Empleando los mismos ejes para la gráfica de la pregunta anterior, dibujar el perfil de un RNA radiactivo obtenido luego de incubar células cultivadas durante 48 horas en ^3H -uridina sin fármaco inhibidor alguno.
5. Supongamos que usted elabora un RNA sintético a partir de un dinucleótido repetido (p. ej., AGAGAGAG) y luego utiliza este RNA como mensajero para sintetizar un polipéptido en un sistema sintetizador de proteínas *in vitro*, como el empleado por Nirenberg y Matthaei para producir polifenilalanina. ¿Qué tipo de polipéptido esperaría producir a partir de este polinucleótido particular? ¿Esperaría tener más de un tipo de polipéptidos producido? ¿Por qué sí o por qué no?
6. Supongamos que encuentra una enzima que se incorpora al azar a nucleótidos dentro de un polímero sin el requerimiento de una plantilla. ¿Cuántos codones diferentes podría encontrar en el RNA sintético elaborado utilizando dos diferentes precursores nucleótidos (p. ej., CTP y ATP)? (Una enzima denominada polinucleótido fosforilasa cataliza este tipo de reacción y se utilizó en estudios para identificar codones.)
7. Dibujar las partes de una globina 15S pre-RNAm marcando las porciones no codificantes.
8. ¿Cuál es el menor número de GTP que se necesitaría para sintetizar un pentapéptido?
9. En los mismos ejes de la gráfica, dibujar dos curvas de re-naturalización (véase la figura 10-20): una para DNA extraído de tejido cerebral de *Xenopus* y la otra de DNA extraído de oocitos de *Xenopus*.
10. ¿Estaría de acuerdo con la siguiente afirmación? El descubrimiento de que la anemia drepanocítica es resultado del cambio en un solo aminoácido demuestra que el código genético no es superpuesto. ¿Por qué sí o por qué no?
11. La talasemia es una enfermedad caracterizada por mutaciones que convierten codones de aminoácidos en codones de terminación. Supongamos que debe comparar los polipéptidos sintetizados *in vitro* a partir de RNAm purificado de una gran variedad de pacientes de talasemia. ¿Cómo esperaría comparar estos polipéptidos? Observe la carta de codones de la figura 11-41. ¿Cuántos codones de aminoácidos pueden convertirse en codones de paro sustituyendo una sola base?
12. ¿Piensa usted que sería posible obtener un código genético con sólo dos letras, A y T? Si su respuesta es afirmativa, ¿cuál sería el menor número de nucleótidos requeridos para elaborar un codón?
13. Durante el alargamiento de una cadena de polipéptidos: 1) el RNAt se desplaza de un codón del RNAr al siguiente; 2) el ribosoma se mueve acercándose al extremo 3' del RNAm; 3) la cadena creciente del polipéptido pasa del RNAt del sitio P al aminoácido presente en el sitio A; 4) el RNAt entra al sitio P vacío. Encierre en un círculo las respuestas correctas.
14. ¿Cómo es posible que la síntesis de RNAm ocurra a una mayor tasa en las células bacterianas que en cualquier otro tipo de RNA, aunque muy poco RNAm se encuentra dentro de esa célula?
15. Si un codón para serina es 5'-AGC-3', el anticodón para este tripleto sería 5'-____-3'. ¿Cómo afectaría la flexibilidad esta interacción codón-anticodón?

BIBLIOGRAFÍA

Código genético y mutagénesis

- Crick, F.C. 1966. The genetic code III. *Sci. Am.* 215:55-62 (oct.).
- Fox, T.D. 1987. Natural variation in the code. *Ann. Rev. Gen.* 21:67-91.
- Khorana, H.G. 1966. Polynucleotide synthesis and the genetic code. *Harvey Lects.* 62:79-106.
- Nirenberg, M.W. 1966. The genetic code II. *Sci. Am.* 208:80-94 (marzo).
- Schimmel, P. 1991. Classes of aminoacyl-tRNA synthetases and the establishment of the genetic code. *Trends Biochem. Sci.* 16:1-3.
- Wong, J.T. 1988. Evolution of the genetic code. *Microbiol. Sci.* 5:174-181.

Transcripción y función del promotor

- Buratowski, S. 1994. The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* 77:1-3.

- Conaway, R.C. y Conaway, J.W. 1993. General initiation factors for RNA polymerase II. *Ann. Rev. Biochem.* 62:161-190.
- Dahmus, M.E. 1994. The role of multisite phosphorylation in the regulation of RNA polymerase II activity. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 48:143-179.
- Das, A. 1993. Control of transcription termination by RNA-binding proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 62:893-930.
- Drapkin, R. y Reinberg, D. 1994. The essential twist. *Nature* 369:523-524.
- Horwitz, M. y Loeb, L.A. 1990. Structure-function relationships in *E. coli* promoter DNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 38:137-164.
- Klug, A. 1993. Opening the gateway. *Nature* 365:486-487.
- Koleske, A.J. y Young, R.A. 1995. The RNA polymerase II holoenzyme and its implications. *Trends Biochem. Sci.* 20:113-116.

McKnight, S.L. y Yamamoto, K. 1992. *Transcriptional Regulation*. Cold Spring Harbor Lab. Press.

Peterson, M.G. y Tijan, R. 1992. The tell-tail trigger. *Nature* 358:620-621.

Struhl, K. 1994. Duality of TBP, the universal transcription factor. *Science* 263:1103-1104.

Young, R.A. 1991. RNA polymerase II. *Ann. Rev. Biochem.* 60:689-715.

Zawel, L. y Reinberg, D. 1993. Initiation of transcription by RNA polymerase II: A multi-step process. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 44:67-108.

Zawel, L. y Reinberg, D. 1995. Common in assembly and function of eukaryotic transcription complexes. *Ann. Rev. Biochem.* 64:533-561.

Núcleolo y síntesis del RNA.

Fournier, M.J. y Maxwell, E.S. 1993. The nucleolar snRNAs: Catching up with the spliceosomal snRNAs. *Trends Biochem. Sci.* 18:131-135.

Miller, O.L., Jr. 1973. The visualization of genes in action. *Sci. Am.* 228:34-42 (marzo).

Scheer, U. y Benavides, R. 1990. Function and dynamic aspects of the mammalian nucleolus. *Bioess.* 12:14-21.

Scheer, U. y cols. 1993. Structure, function and assembly of the nucleolus. *Trends Cell Biol.* 3:236-241.

Scheer, U. y Weisenberger, D. 1994. The nucleolus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:354-359.

Soilner-Webb, B. y Mougey, E.B. 1991. News from the nucleolus: rRNA gene expression. *Trends Biochem. Sci.* 16:58-62.

Sollner-Webb, B. 1993. Novel intron-encoded small nucleolar RNAs. *Cell* 75:403-405.

Ribozimas

Barinaga, M. 1993. Ribozymes: Killing the messenger. *Science* 262:1512-1513.

Benner, S.A. 1993. Catalysis: Design versus selection. *Science* 261:1402-1403.

Cech, T.R. 1986. RNA as an enzyme. *Sci. Am.* 255:64-75 (nov.).

Cech, T.R. 1993. Catalytic RNA: Structure and mechanism. *Biochem. Soc. Trans* 21:229-234.

Cech, T.R. 1993. Fishing for fresh catalysis. *Nature* 365:204-205.

Gray, M.W. y Cedergren, R., eds. 1993. The new age of RNA. *FASEB J.* 7:123.

Joyce, G.F. 1992. Directed molecular evolution. *Sci. Am.* 267:90-97 (dic.).

Lorsch, J.R. y Szostak, J.W. 1994. In vitro evolution of new ribozymes with polynucleotide kinase activity. *Nature* 371:31-36.

Moore, M.J. 1995. Ribozymes: Exploration by lamplight. *Nature* 374:766-767.

Szostak, J.W. 1993. In vitro genetics. *Trends Biochem. Sci.* 17:89-93.

von Ahsen, U. y Schroeder, R. 1993. RNA as a catalyst: Natural designed ribozymes. *Bioess.* 15:299-307.

Yu, H. y cols. 1993. A hairpin ribozymes inhibits expression of diverse strains of human immunodeficiency virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6340-6344.

Procesamiento de RNA y evolución de los intrones

Cavalier-Smith, T. 1991. Intron phylogeny: A new hypothesis. *Trends Genetics* 7:145-148.

Dreyfuss, G. y cols. 1993. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Ann. Rev. Biochem.* 62:289-321.

Gesteland, R.F. y Atkins, J.F. eds. 1993. *The RNA World*. Cold Spring Harbor Lab. Press.

Green, M.R. 1991. Biochemical mechanisms of constitutive and regulated pre-mRNA splicing. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7:559-599.

Hurst, L.D. 1994. The uncertain origin of introns. *Nature* 371:381-382.

Kohtz, J.D. y cols. 1994. Protein-protein interactions and 5'-splice site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature* 368:119-124.

Lambowitz, A.M. y Belfort, M. 1993. Introns as mobile genetic elements. *Ann. Rev. Biochem.* 62:587-622.

Lamond, A. I. 1993. The spliceosome. *Bioess.* 15:595-603.

McKeown, M. 1993. The role of small nuclear RNAs in splicing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:448-454.

Newman, A. 1994. Small nuclear RNAs and pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:360-367.

Nielsen, T.W. 1994. RNA-RNA interactions in the spliceosome: Unraveling the ties that bind. *Cell* 78:1-4.

Pyle, A.M. 1993. Ribozymes: A distinct class of metalloenzymes. *Science* 261:709-714.

Sharp, P.A. 1994. Split genes and RNA splicing. *Cell* 77:805-815 (Nobel lecture).

Spector, D.L. 1993. Nuclear organization of pre-mRNA processing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:442-447.

Spector, D.L. 1994. Cycling splicing factors. *Nature* 369:604.

Steitz, J.A. 1992. Splicing takes a Holliday. *Science* 257:888-889.

Stoltzfus, A. y cols. 1994. Testing the exon theory of genes: The evidence from protein structure. *Science* 265:202-207.

Wahle, E. 1992. The end of the message: 3' end processing leading to polyadenylated messenger RNA. *Bioess.* 14:113-118.

Wahle, E. y Keller, W. 1992. The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Ann. Rev. Biochem.* 61:419-440.

Weiner, A.M. 1993. mRNA splicing and autocatalytic introns: Distant cousins or the products of chemical determination. *Cell* 72:161-164.

Wise, J.A. 1993. Guide to the heart of the spliceosome. *Science* 262:1978-1979.

Xing, Y. y cols. 1993. Higher level organization of individual gene transcription and RNA splicing. *Science* 259:1326-1330.

RNA de transferencia y RNAt sintetasas

Giege, R. y cols. 1993. tRNA structure and aminoacylation efficiency. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 45:129-206.

Holley, R.W. 1966. The nucleotide sequence of a nucleic acid. *Sci. Am.* 214:30-39 (feb.).

McClain, W.H. 1993. Transfer RNA identity. *FASEB J.* 7:72-78.

Mora3, D. 1992. Structure and function relationship between aminoacyl-tRNA synthetases. *Trends Biochem. Sci.* 17:159-164.

Rich, A. y Kim, S.H. 1978. The three-dimensional structure of transfer RNA. *Sci. Am.* 238:52-62 (ene.).

Saks, M.E., Sampson, J.R. y Abelson, J.N. 1994. The transfer RNA identity problem: A search for rules. *Science* 263:191-197.

Traducción

Clark, B. 1980. The elongation step in protein synthesis. *Trends Biochem. Sci.* 5:207-210.

Hill, W.E. y cols. 1990. *The Ribosome: Structure, Function, and Evolution*. Am. Soc. Microbiol.

Jacques, N. y Dreyfus, M. 1990. Translation initiation in *Escherichia coli*: old and new questions. *Mol. Microbiol.* 4:1063-1067.

Kisselev, L.L. y Wolfson, A.D. 1994. Aminoacyl-tRNA synthetases from higher eukaryotes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 48:83-142.

- Kurland, C.G. 1992. Translational accuracy and the fitness of bacteria. *Ann. Rev. Genetics* 26:29-50.
- Lake, J.A. 1981. The ribosome. *Sci. Am.* 245:84-97 (ago.).
- Lewin, B. 1994. *Genes V*. Oxford University Press.
- Linder, P. y Prat, A. 1990. Baker's yeast, the new workhorse in protein synthesis studies: Analyzing eukaryotic translation initiation. *Bioess.* 12:519-526.
- Maden, T. 1993. The translational apparatus, from Berlin. *Trends Biochem. Sci.* 18:155-157.
- Merrick, W.C. 1992. Mechanisms and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol. Revs.* 56:291-315.
- Moldave, K. 1985. Eukaryotic protein synthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 54:1109-1149.
- Noller, H.F. 1991. Ribosomal RNA and translation. *Ann. Rev. Biochem.* 60:191-227.
- Noller, H.F. 1993. tRNA-rRNA interactions and peptidyl transferase. *FASEB J.* 7:87-89.
- Schimmel, P. 1993. GTP hydrolysis in protein synthesis: Two for Tu? *Science* 259:1264-1265.
- Schroeder, R. 1994. Dissecting RNA function. *Nature* 370:597-598.
- Sprinzl, M. 1994. Elongation factor Tu: a regulatory GTPase with an integrated effector. *Trends Biochem. Sci.* 19:245-250.
- Weijland, A. y Parmeggiani, A. 1994. Why do two EF-Tu molecules act in the elongation cycle of protein biosynthesis? *Trends Biochem. Sci.* 19:188-193.
- Yonath, A. y Wittman, H.G. 1989. Challenging the three-dimensional structure of ribosomes. *Trends Biochem. Sci.* 14:329-335.

Núcleo de la célula y control de la expresión de genes

12-1 El núcleo de una célula eucariota

La perspectiva humana: Aberraciones cromosómicas

12-2 Control de la expresión de genes en procariotes

12-3 Control de la expresión de genes en eucariotes

La vía experimental: Genes que controlan el desarrollo embrionario



FIGURA 12-A. Cromosomas humanos durante la metafase marcados con fluorescencia mediante hibridación *in situ* con DNA procedente de seis distintas fuentes, cada uno específico para un cromosoma diferente. Los cromosomas marcados se filmaron con una cámara de imágenes digitales y se pseudocolorearon mediante procesamiento en computadora. Los cromosomas 1, 2, 4, 8, 14 y X aparecen en verde, violeta, blanco, naranja, rojo y amarillo, respectivamente. Otros cromosomas aparecen en azul. (Cortesía de Thomas Ried y David C. Ward, Yale University.)

A pesar de diferencias obvias en forma y función, las diversas células que constituyen un organismo multicelular, sea hongo, árbol o mamífero, contienen un conjunto completo de genes. Una célula cartilaginosa y una neurona muestran pequeña semejanza exterior, aunque ambos tipos de células contienen el mismo complemento de genes. La información genética presente en una célula eucariota especializada se puede comparar con los planos elaborados para construir un gran edificio de muchas habitaciones. Durante el proceso de construcción, probablemente será necesario consultar todos los mapas, pero en el trabajo para un piso o una habitación particular sólo debe consultarse un pequeño subconjunto de esta información. Lo mismo puede decirse de un huevo fertilizado que contiene una dotación completa de instrucciones genéticas que deben duplicarse fielmente y distribuirse a cada una de las células del organismo en desarrollo. Como resultado, las células contienen mucho más información genética de la que podrán utilizar en toda su existencia. En consecuencia, las células contienen mecanismos que les permiten expresar su información genética *selectivamente* siguiendo sólo las instrucciones relevantes para dicha célula en ese momento particular. En este capítulo se exploran algunas maneras en que las células controlan la expresión del gen, lo que garantiza que se sintetizan ciertas proteínas y otras no. Sin embargo, primero describiremos la estructura y propiedades del núcleo de las células eucariotas en el cual reside casi todo el mecanismo de regulación.

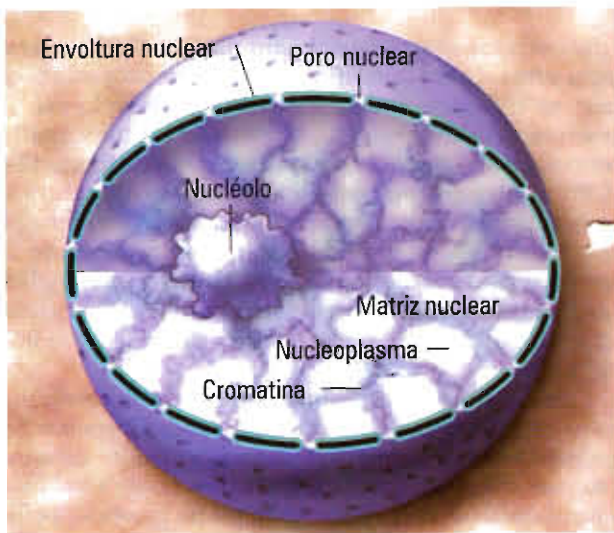
12-1 El núcleo de una célula eucariota

Considerando su importancia en el almacenamiento y utilización de la información genética, el núcleo de una célula eucariota tiene morfología más bien común (fig. 12-1, a). El contenido del núcleo aparece como masa viscosa amorfa de material contenido en una *envoltura nuclear* compleja. Dentro del núcleo de una célula típica en su interfase (o sea, no mitótica) se incluyen: 1) los cromosomas, visibles como fi-

bras muy largas de nucleoproteína llamada *cromatina*; 2) la *matriz nuclear*, que es una red fibrilar que contiene proteínas; 3) uno o más *nucléolos*, que son estructuras amorfas electrónicamente densas que sirven para sintetizar RNA ribosómico y en el ensamblado de ribosomas (estudiado en la página 446), y 4) el *nucleoplasma*, sustancia líquida en la cual se disuelven los solutos del núcleo. Los diferentes elementos de un núcleo eucariota se muestran esquemáticamente en la figura 12-1, b.



(a) 1 μm



(b)

FIGURA 12-1. El núcleo de la célula. a) Micrografía electrónica de una interfase del núcleo de la célula HeLa que muestra un par de nucléolos y cromatina dispersa. Es evidente que la heterocromatina (pág. 498) rodea toda la superficie interna de la envoltura nuclear. Se observan dos regiones prominentes y también grumos de cromatina dispersos a través del nucleoplasma. b) Dibujo esquemático que muestra algunos de los principales componentes del núcleo. (a: Según Werner W. Franke, Int. Rev. Cytol. [Suppl.] 4:130, 1974.)

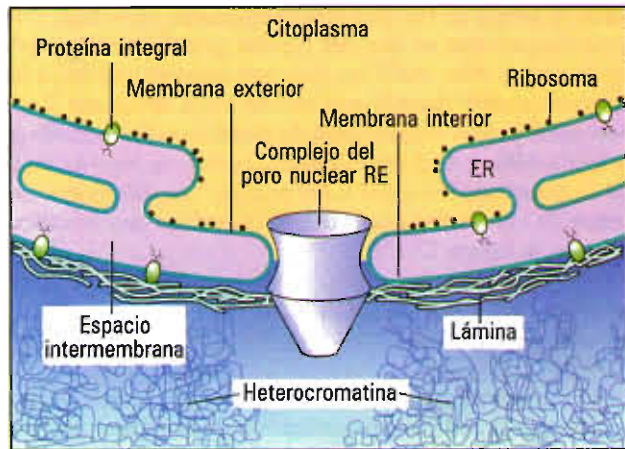
Envoltura nuclear

El término **envoltura nuclear**, en oposición a *membrana nuclear*, denota la compleja organización de la estructura en la frontera entre el núcleo y el citoplasma de una célula eucariota. La separación del material genético celular del citoplasma que la rodea puede ser la característica única más importante que distingue a los eucariotes de los procariotes, lo que confiere al aspecto de la envoltura nuclear el carácter de punto de referencia en la evolución biológica. La envoltura nuclear consta de varios elementos (fig. 12-2, a). La continuidad de la envoltura nuclear como estructura limitante se mantiene por medio de un par de membranas concéntricas separadas por un *espacio intermembrana* de 10 a 50 nm. Las dos membranas se funden en diferentes sitios formando un poro circular que contiene un armazón complejo de proteínas. La densidad de los poros nucleares varía de casi 2 a 4 por μm^2 en la envoltura nuclear del eritrocito metabólicamente inactivo de un ave, hasta más de 60 por μm^2 en la envoltura nuclear de un oocito que se prepara para los requerimientos provenientes del desarrollo embrionario. La célula promedio de los mamíferos contiene cerca de 3 000 poros nucleares. En la membrana externa por lo general se observan ribosomas dispersos y casi siempre se continúa con la membrana del retículo endoplásmico (fig. 12-2, a).

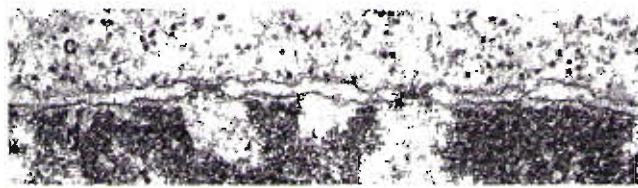
La superficie interna de la envoltura nuclear se encuentra revestida por una red fibrilar densa, denominada **lámina nuclear**. En algunas células, como los oocitos de los anfibios, la lámina nuclear forma una capa bastante continua (fig. 12-3), en tanto que en otras células aparece más fragmentada. Se piensa que la lámina nuclear actúa como apoyo estructural para la envoltura nuclear y sirve también como sitio para anclar las fibras de cromatina en la periferia del núcleo (fig. 12-2, b). Las fibrillas de la lámina nuclear tienen aproximadamente 10 nm de diámetro y se componen de polipéptidos, llamados *láminas*, que pertenecen a la misma familia de superpolipéptidos que constituyen los filamentos intermedios de 10 nm del citoesqueleto (pág. 350). Igual que los filamentos intermedios del citoplasma, la integridad de la lámina nuclear es regulada por fosforilación y desfosforilación. Al parecer, el desensamblado de la lámina nuclear antes de la mitosis es inducido por fosforilación de las láminas mediante una cinasa específica (sección 14-2).

Estructura y función del complejo de poros nucleares

La envoltura nuclear es la barrera entre dos de los principales compartimientos de la célula: el núcleo y el citoplasma,



(a)



(b)

0.2 μm

FIGURA 12-2. La envoltura nuclear. a) Diagrama esquemático que muestra la doble membrana, poros nucleares, lámina nuclear y la continuidad de la membrana externa con el retículo endoplásmico rugoso. b) Micrografía electrónica de un corte a través de una parte de la envoltura nuclear de una célula del extremo de una radícula de cebolla. Nótese la doble membrana con el espacio intermembrana, los complejos de los poros nucleares y la heterocromatina relacionada que no se extiende al interior de la región de los poros nucleares. (b: Según Werner W. Franke y cols. *J. Cell Biol.* 91:47s, 1981; con permiso de Rockefeller University Press.)

y los poros nucleares constituyen las puertas a través de la barrera. A diferencia de la membrana plasmática, que evita el paso de macromoléculas entre el citoplasma y el espacio extracelular, la envoltura nuclear es un punto de gran actividad para el movimiento de RNA y proteínas en ambas direcciones entre los compartimientos que separa. La duplicación y transcripción del material genético dentro del núcleo requiere la participación de numerosas proteínas que deben sintetizarse en el citoplasma y transportarse a través de la envoltura nuclear. A la inversa, los RNAm, RNAt y las subunidades ribosómicas elaboradas en el núcleo deben transportarse a través de la envoltura nuclear en la dirección opuesta. Algunos componentes, como los RNAnp, se mueven en ambas direcciones; se sintetizan en el núcleo, se ensamblan para formar las partículas de RNP en el citoplasma, y luego regresan al núcleo donde participan en el procesamiento del RNAm. Todo este tráfico se canaliza a través de los poros nucleares.

Puesto que materiales tan grandes como las subunidades ribosómicas pueden deslizarse a través de los poros nucleares (fig. 12-4), podríamos asumir que son simplemente canales abiertos, pero es todo lo contrario. Los poros nucleares contienen un aparato complejo en forma de canastilla

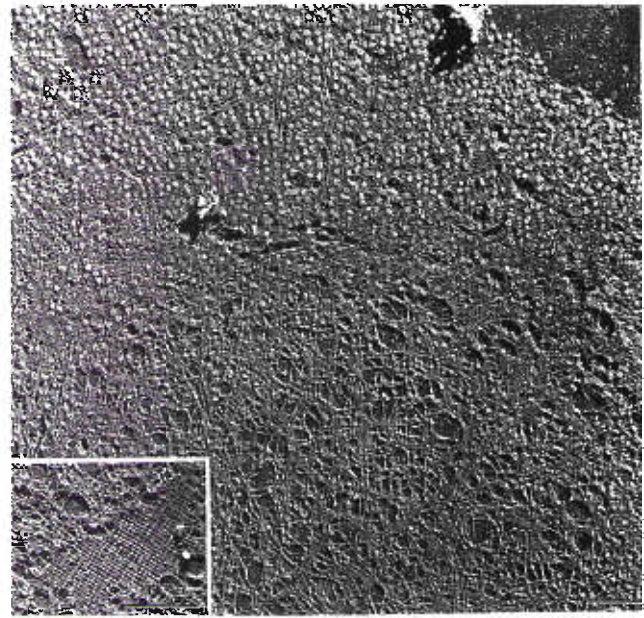
2 μm

FIGURA 12-3. La lámina nuclear. Micrografía electrónica de una envoltura nuclear congelada en seco y sombreada con metal de un oocito de *Xenopus* extraído con el detergente no iónico Tritón X-100. La lámina parece más bien como una red continua que incluye filamentos orientados regularmente en dirección perpendicular entre sí. El recuadro muestra una región bien preservada de la cual se han quitado mecánicamente los poros nucleares. (Reimpreso con permiso de Ueli Aebi y cols. *Nature* 323:561, 1986; copyright 1986 Macmillan Magazines Limited.)

lla denominado **complejo del poro nuclear (CPN)**, que se adapta sobre el poro igual que un tapón y se proyecta hacia afuera en dirección al citoplasma y al nucleoplasma. La estructura del CPN puede observarse en las micrografías electrónicas de la figura 12-5 y los modelos de la figura 12-6. El CPN es un complejo molecular enorme que muestra simetría octagonal y contiene de 100 a 200 polipéptidos; la masa de un CPN es casi 30 veces la de un ribosoma. Se cuenta con modelos cada vez más refinados de la complicada estructura del CPN conforme se desarrollan técnicas más poderosas de microscopía electrónica y de análisis por imagen.

Cuando se inyectan solutos de bajo peso molecular dentro del citoplasma de una célula, pueden penetrar con rapidez a través de los poros nucleares por simple difusión. Se sugiere que estos compuestos se desplazan a través de las hendiduras situadas entre los rayos de la canastilla (fig. 12-6, a). La capacidad de moléculas mayores (como proteínas y nucleoproteínas) para pasar del citoplasma al núcleo depende de que sean o no residentes normales del núcleo. Por ejemplo, cuando una proteína no nuclear, como la albúmina del suero bovino, se marca con isótopo radiactivo y se inyecta en el citoplasma, tiende a permanecer en el citoplasma. Por lo contrario, cuando se efectúa el mismo experimento con una proteína nuclear, como la nucleoplasmina, la proteína marcada penetra con rapidez al núcleo.

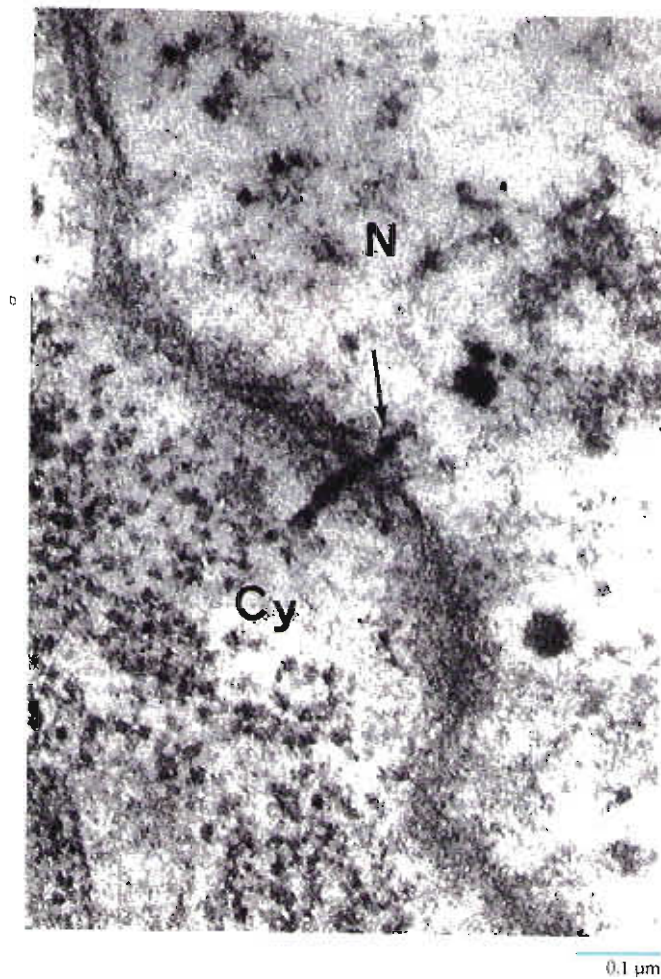
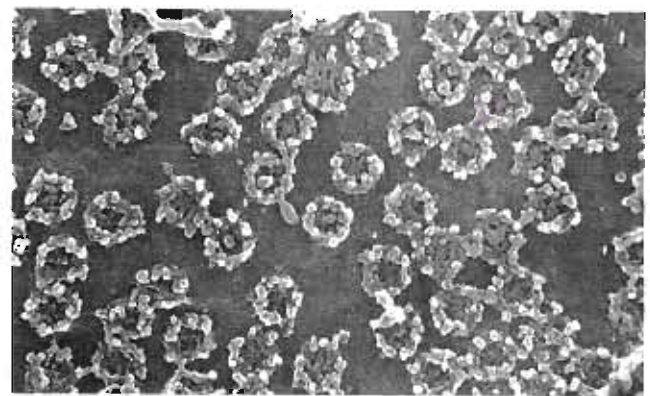


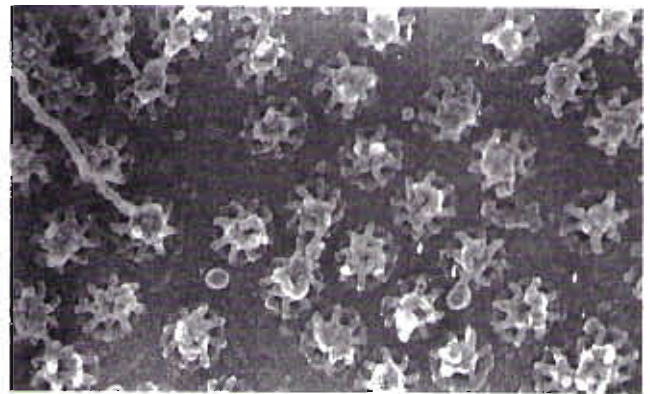
FIGURA 12-4. Movimiento de materiales a través del poro nuclear. Micrografía electrónica de un corte a través de la envoltura nuclear de una célula de insecto mostrando el movimiento de material granular a través del poro nuclear desde el núcleo (N) al interior del citoplasma (Cy). (Según Barbara J. Stevens y Hewson Swift, J. Cell Biol. 31:72, 1966; con permiso de Rockefeller University Press.)

En 1982, Robert Laskey y sus colaboradores, del Medical Research Council de Inglaterra, observaron que la nucleoplasmina, una de las proteínas nucleares más abundantes en los oocitos de anfibios, contiene un tramo de aminoácidos cerca de su C terminal que actúa como *señal de localización nuclear* (SLN), lo que permite a la proteína atravesar los poros nucleares y entrar al núcleo. Desde entonces se han identificado muchas SLN, la mayor parte de las cuales constan de uno o dos tramos cortos de aminoácidos con carga positiva. Por lo tanto, la orientación de las proteínas hacia el núcleo es similar en principio al tráfico de otras proteínas destinadas a ser aisladas dentro de un organelo particular, como una mitocondria (pág. 197) o un peroxisoma (pág. 197). En todos estos casos, las proteínas poseen una "dirección postal" específica que puede reconocer a un receptor determinado situado en la superficie del organelo al cual va dirigida.

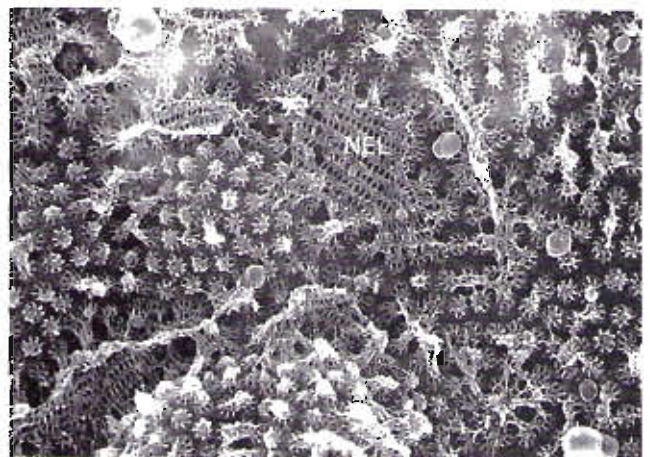


(a)

0.2 μm



(b)



(c)

0.6 μm

FIGURA 12-5. Aspecto con el microscopio electrónico del complejo del poro nuclear tomado de una envoltura nuclear aislada de un oocito de anfibio. a) La cara citoplásmica de la envoltura nuclear muestra los granos citoplásmicos periféricos del complejo del poro nuclear. b) La cara nuclear de la envoltura nuclear muestra el aspecto en forma de canastilla de la porción interna del complejo. c) La cara nuclear de la envoltura muestra la distribución de las canastillas del CPN (b) y los sitios donde se retienen las placas intactas de la lámina nuclear (NEL). La lámina se encuentra fija a la cara interna de las canastillas del complejo de poros nucleares. En todas estas micrografías, las envolturas nucleares aisladas se fijaron, se deshidrataron, se secaron y recubrieron con metal. (Según M.W. Goldberg y T.D. Allen, J. Cell Biol. 119:1431-1433, 1992; con permiso de Rockefeller University Press.)

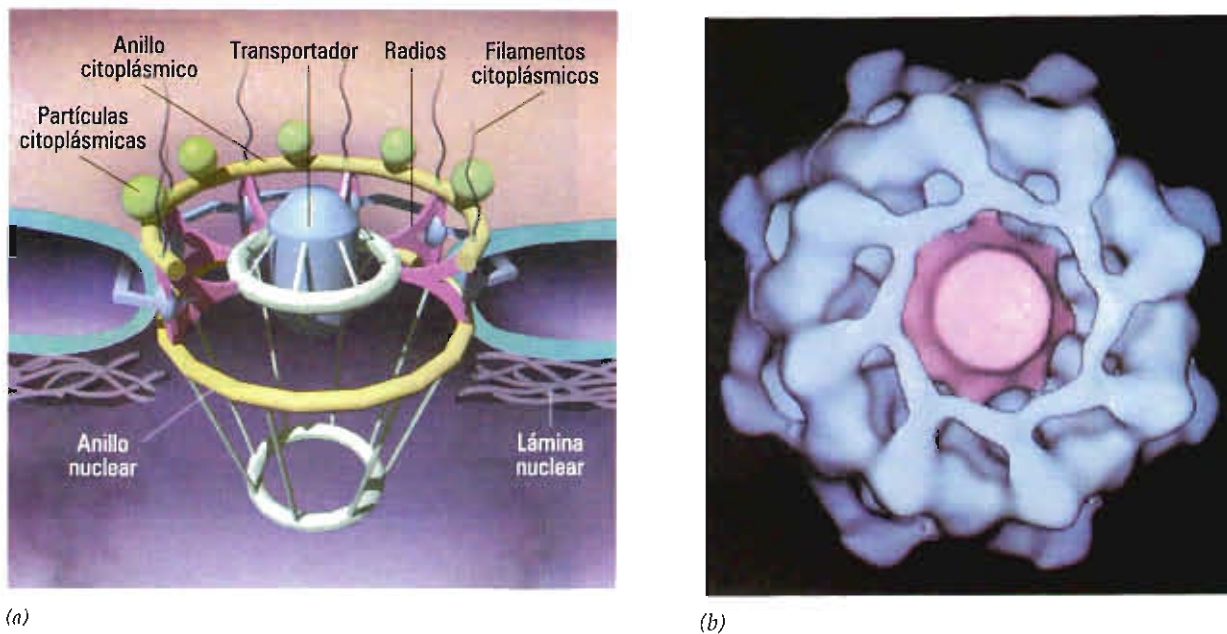


FIGURA 12-6. Modelo del complejo de poro nuclear. *a)* Representación tridimensional de un complejo de poro nuclear como se puede observar dentro de la envoltura nuclear. El anillo citoplásmico se seccionó y separó para revelar el transportador. Se cree que los materiales que difunden a través de la envoltura nuclear atraviesan la abertura entre los rayos del anillo. También se piensa que los materiales transportados selectivamente al interior del núcleo primero se unen a los delgados filamentos que se prolongan desde el exterior del anillo al interior del citoplasma. Estos materiales al parecer inducen un cambio de conformación en el transportador que provoca que se desplacen al interior del nucleoplasma. *b)* Modelo tridimensional basado en la microscopia electrónica de alta resolución mostrando el poro nuclear como se observaría desde el citoplasma. Se notan las uniones entre el transportador (mostrado en rosa) y los rayos del anillo que lo rodea. (*a:* Según Christopher W. Akey y Michael Rademacher, *J. Cell Biol.* 122:15, 1993; con permiso de Rockefeller University Press; *b:* cortesía de Christopher Akey.)

La introducción de proteínas al núcleo ocurre en varias etapas. En el primer paso, la proteína que debe introducirse se une a un receptor de SLN, que al parecer se localiza a lo largo de los filamentos que se prolongan al interior del citoplasma desde el anillo exterior del complejo del poro (fig. 12-7). La interacción entre la proteína nuclear y el receptor de SLN conduce a la proteína hacia la cara citoplásmica del complejo del poro nuclear. El desplazamiento de la proteína a través del poro requiere la energía liberada por hidrólisis de ATP y se cree que implica un cambio de conformación del *transportador*, la voluminosa estructura semejante a un tapón situada en el centro del poro nuclear (fig. 12-6, *b*). El cambio de conformación puede abrir un canal acuoso en el centro del transportador y permitir que las moléculas unidas entren al nucleoplasma; por lo contrario, los materiales que pasan del núcleo al citoplasma tal vez provoquen la abertura del transportador en la dirección opuesta.

Un solo poro nuclear permite el paso de proteínas y la salida de RNA. Este transporte en ambas direcciones se ilustra en la micrografía de la figura 12-8. Los puntos negros más pequeños observados en la fotografía son partículas de oro recubiertas con RNA de transferencia e inyectadas dentro del núcleo de la célula; se han desplazado a través del poro al interior del citoplasma. Los puntos negros de mayor tamaño son partículas de oro más grandes recubiertas con la proteína nuclear nucleoplasmina e inyectadas en el citoplasma de la célula; se desplazan a través del

mismo poro en la dirección opuesta hacia el interior del núcleo.

Cromosomas

Al parecer, los cromosomas se muestran al principio de la mitosis y desaparecen una vez que ésta concluye, por lo que plantean a los citólogos una de las preguntas más importantes pero desafiantes: ¿Cuál es la naturaleza del cromosoma en la célula no mitótica? Cuando se observan con el microscopio electrónico, la mayor parte de los organelos subcelulares revelan una estructura que proporciona muchos conocimientos acerca de su organización y su función. Sin embargo, las micrografías electrónicas de cortes delgados a través del núcleo por lo general revelan muy poco de la naturaleza de los cromosomas durante la interfase (fig. 12-1, *a*).

Empaquetamiento del genoma

Una célula humana promedio contiene casi 6 000 millones de pares de bases de DNA divididas entre 46 cromosomas (cifra para un número de cromosomas diploides no duplicados). Cada cromosoma contiene una sola molécula continua de DNA; cuanto mayor sea el cromosoma más largo el DNA que contiene. Puesto que cada par de bases ocupa casi 0.34 nm de longitud de una molécula de DNA, 6 000 millones de pares de bases equivalen a una molécula de DNA de

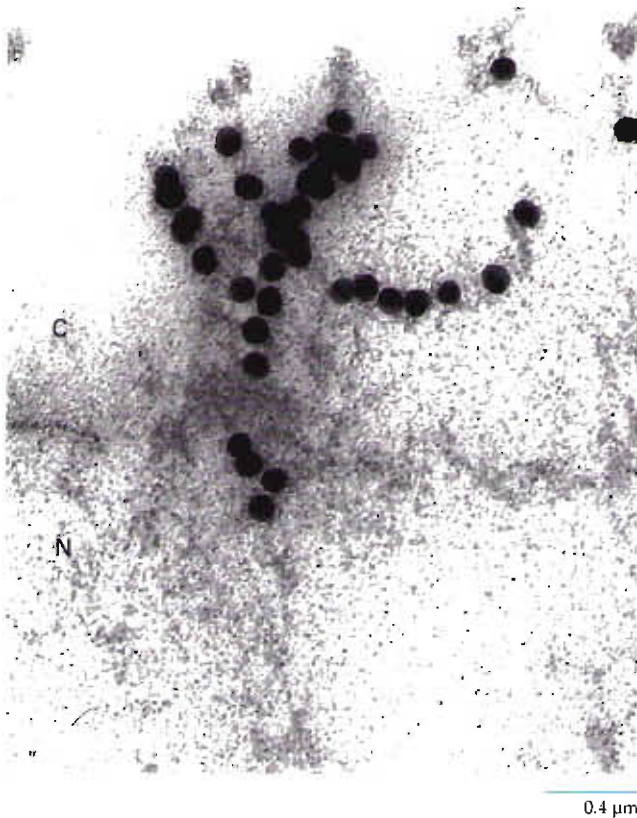


FIGURA 12-7. Captación selectiva de proteínas nucleares dentro del núcleo. La nucleoplasmina es una proteína presente en alta concentración en el nucleoplasma de los oocitos de *Xenopus*. Cuando se recubren partículas de oro con nucleoplasmina y se inyectan en el citoplasma (C) del oocito de *Xenopus*, se observa que se enlazan a los filamentos citoplásmicos que se prolongan desde el exterior del anillo del complejo de poro nuclear. También se observan varias partículas en tránsito a través del poro hacia el interior del núcleo (N). (Según W.D. Richardson y cols. *Cell* 52:662, 1988; con permiso de Cell Press, fotografía cortesía de A.D. Mills.)

dos metros de largo. Además, el DNA del interior de una célula se enlaza a gran cantidad de agua (casi seis moléculas de agua por par de bases), que expande su volumen aún más. ¿Cómo es posible fijar dos metros de DNA hidratado en un núcleo de sólo 10 μm de diámetro y, más aún, mantener el DNA en estado accesible a enzimas y proteínas reguladoras? De igual importancia, ¿cómo se organiza la única molécula de DNA de cada cromosoma de modo que no se enrede irremediamente con las moléculas de otros cromosomas? La respuesta estriba en el notable empaquetamiento de una molécula de DNA.

Desde hace mucho se sabe que los cromosomas contienen fibras de una sustancia llamada **cromatina**, compuesta de DNA y proteína. Las proteínas de la cromatina por lo general se dividen en dos principales grupos: histonas y proteínas cromosómicas no histonas. Las **histonas** constan de un conjunto de proteínas básicas pequeñas bien definidas, y las **proteínas cromosómicas no histonas** incluyen numerosas proteínas reguladoras enzimáticas de estructura muy diversa, la mayor parte de las cuales aún no están

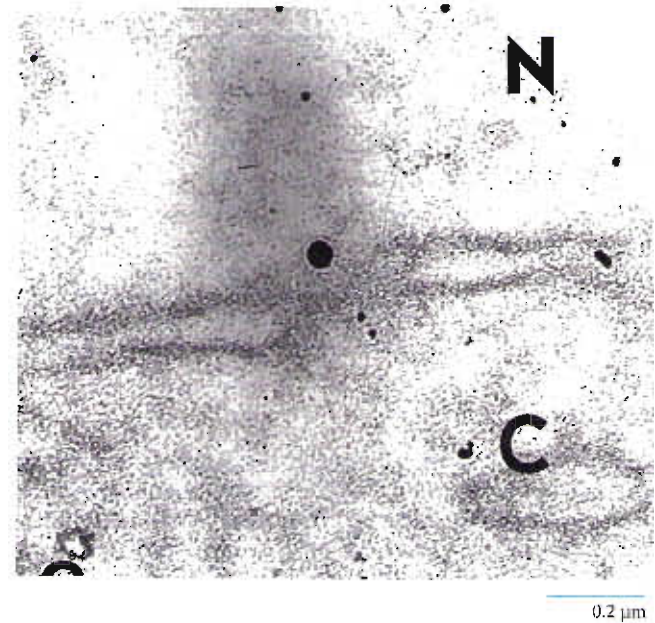


FIGURA 12-8. Demostración experimental del movimiento en ambas direcciones de macromoléculas a través del poro nuclear. Como se describe en el texto, las partículas de oro recubiertas con RNA de transferencia (puntos negros más pequeños) e inyectadas en el núcleo de la célula (N) se mueven al interior del citoplasma (C), en tanto que las partículas de oro recubiertas con la proteína nuclear nucleoplasmina (puntos negros de mayor tamaño) e inyectadas en el citoplasma de la célula se desplazan a través del mismo poro en la dirección opuesta hacia el interior del núcleo. (Según S.I. Dvoretzky y Carl M. Feldherr, *J. Cell Biol.* 106:581, 1988; con permiso de Rockefeller University Press.)

bien caracterizadas. La cromatina también contiene un pequeño porcentaje de RNA, compuesto sobre todo de cadenas de RNA en diferentes etapas del proceso de formación y RNAnp implicado en el empalme de los RNAm.

Nucleosomas: el menor nivel de organización de los cromosomas. El empaquetamiento ordenado del DNA eucariota depende de las histonas, un notable conjunto de proteínas divididas en cinco grupos distintos fáciles de distinguir por su contenido de lisina y arginina (cuadro 12-1). Las histonas se diversifican aún más mediante algunas modificaciones de los aminoácidos, como fosforilación o acetilación, que ocurren luego de la síntesis de polipéptidos. Las secuencias de aminoácidos de las histonas, particularmente H3 y H4, han sufrido muy pocos cambios a través de periodos muy prolongados de la evolución. Por ejemplo, la histona H4 de los guisantes y de las vacas contiene 102 aminoácidos y su secuencia sólo difiere en dos residuos amino. Esta conservación evolutiva extrema sugiere que cada uno de estos aminoácidos desempeña un papel útil en la función de las proteínas.

A principios del decenio de 1970 se observó que cuando se trata cromatina con nucleasas inespecíficas, la mayor parte del DNA se convierte en fragmentos de 200 pares de bases de longitud, aproximadamente, o algún múltiplo de dicho tamaño (fig. 12-9). En contraste, un tratamiento similar del DNA desnudo produce una población de fragmentos cuyo

CUADRO 12-1. Histonas del timo de ternera

Histona	Número de residuos	Masa (kD)	% Arg	% Lis	UIPE* ($\times 10^{-6}$ año)
H1	215	23.0	1	29	8
H2A	129	14.0	9	11	60
H2B	125	13.8	6	16	60
H3	135	15.3	13	10	330
H4	102	11.3	14	11	600

* Unidad del periodo evolutivo: el tiempo para que la secuencia de aminoácidos de una proteína cambie 1% después de la divergencia de dos especies.

tamaño se distribuye al azar. Estos datos sugieren que los pedazos uniformes del DNA cromosómico están protegidos del ataque enzimático, al parecer por su asociación periódica a las proteínas. En 1974, utilizando el dato de la digestión de nucleasa junto con otros diferentes tipos de información, Roger Kornberg, de la Universidad de Harvard, propuso un nuevo tipo de estructura para la cromatina. Sugirió que el DNA y las histonas se organizan en subunidades repetitivas denominadas **nucleosomas**. En la actualidad se sabe que cada nucleosoma contiene una *partícula central del nucleosoma*, que consta de 146 pares de bases de superhélices de DNA (pág. 400) enrolladas casi dos veces alrededor de un complejo cuneiforme de ocho moléculas de histona. El complejo central de la histona consta de dos moléculas de cada una de las siguientes histonas H2A, H2B, H3 y H4 (fig. 12-10, a). Las partículas centrales del nucleosoma se conectan entre sí mediante un tramo de DNA de unión de longitud variable, pero en condiciones típicas de casi 60 pares de bases. Juntos, el DNA del nucleosoma y el de unión tienen casi 200 pares de bases, que corresponden al valor descubierto en los primeros experimentos con nucleasa (fig. 12-9). Las partículas centrales del nucleosoma, que tienen casi 10 nm de diámetro, y el DNA de unión desnudo, que es de casi 2 nm de diámetro, aparecen en las micrografías electrónicas como "cuentas de rosario" (fig. 12-10, b). Según se analiza más adelante, una molécula de histona H1 normalmente se localiza justo afuera de la partícula central del nucleosoma y se relaciona con ambos extremos del DNA conforme entra y sale de la partícula central (fig. 12-10, a). La imagen que se muestra en la figura 12-10, b, se observa luego que las moléculas de histona H1 son eliminadas selectivamente de las fibras de cromatina al exponer la preparación a soluciones de baja concentración salina antes de la observación.

Los residuos básicos de aminoácidos del núcleo central de las histonas se agrupan sobre uno o ambos extremos de la molécula, y por lo tanto el resto de la molécula permanece con carácter relativamente hidrofóbico. Esta separación es ideal para la organización del nucleosoma. Las partes más hidrofóbicas, partes no cargadas de las histonas, ocupan el centro de la partícula del nucleosoma y por lo tanto promueven su agregación en un núcleo apretado. Por lo contrario, las partes básicas polares del núcleo de las histonas forman apéndices flexibles dirigidos hacia el exterior de la partícula, donde los residuos con carga positiva se en-

cuentran disponibles para generar interacciones iónicas con grupos fosfato cargados negativamente del esqueleto de DNA. Aun cuando el DNA se encuentra íntimamente asociado con el núcleo de la histona sobre la superficie interna de la fibra helicoidal, la superficie externa del DNA todavía está expuesta y accesible para interactuar con moléculas reguladoras.

Estudios recientes con cristalografía de rayos X sugieren que los residuos con carga positiva ocurren en pares sobre la superficie de la histona octamérica. Estos sitios de pares ocurren a lo largo de una espiral situada en la vía esperada del DNA a medida que rodea la porción central (mostrada en el modelo de la figura 12-11). Se piensa que los sitios de pares situados en la superficie de la histona octamérica proporcionan "puntos de fijación" para las dos cadenas de la hélice del DNA. Puesto que todas las moléculas de DNA de cualquier origen y cualquier secuencia de nucleótidos contienen un esqueleto idéntico de azúcar y fosfatos para interactuar con las histonas, no es sorprendente que las secuencias de aminoácidos de las histonas sean altamente conservadas.

Con una proporción de casi nueve moléculas de histona por cada 200 pares de bases de DNA, sería de esperar que una célula humana con 6 000 millones de pares de DNA contenga casi 300 millones de moléculas de histona. Esta es la razón de que las células en proceso de división rápida requieran un número repetido de genes de histona (pág. 409) para satisfacer sus necesidades de producción de histonas.

La interacción entre histonas y DNA es principalmente estructural y relativamente independiente de la secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, un DNA que normalmente no se asocia a histonas, como el de los bacteriófagos o de polinucleótidos sintéticos de doble cadena, se incorpora a las subunidades nucleosómicas cuando se incuba *in vitro* con histonas purificadas derivadas de plantas o animales. Estos tipos de experimentos también ilustran la capacidad del nucleosoma para autoensamblado.

Aunque el enlace de histonas a DNA no sigue una secuencia específica, no se puede deducir que las partículas centrales del nucleosoma necesariamente se sitúen en sitios al azar dentro de determinado gen. En realidad, se ha demostrado que ciertas partes de los genes poseen una relación invariable con las partículas nucleosómicas centrales cercanas. La micrografía electrónica de la figura 12-12 mues-

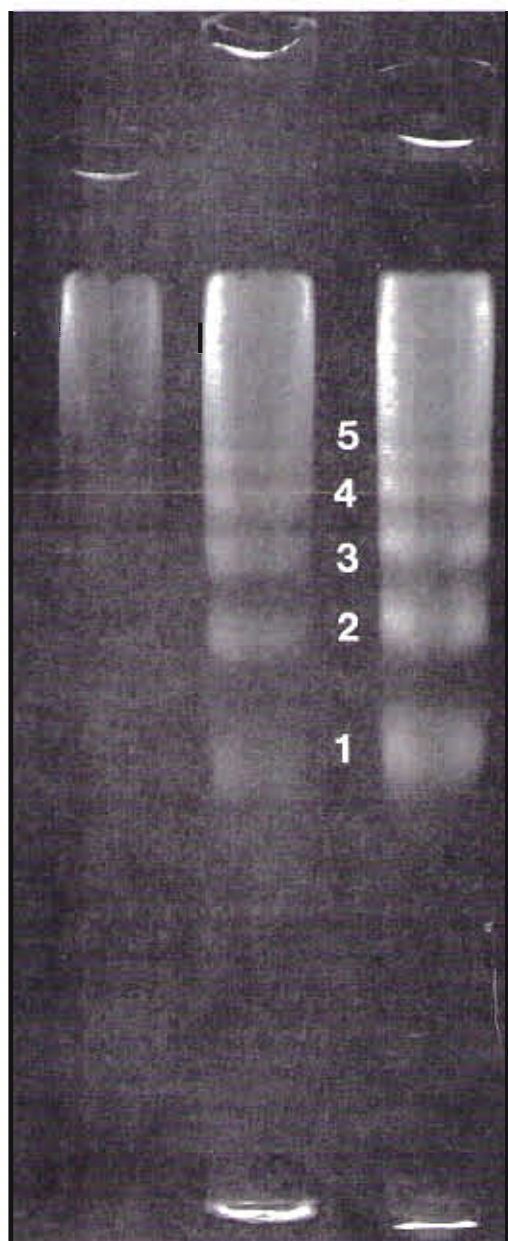
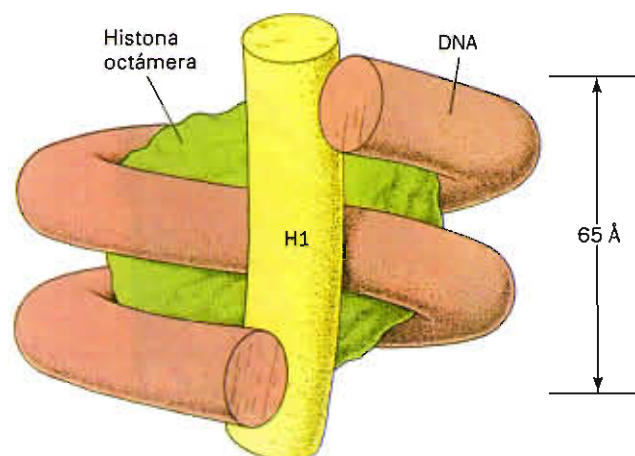
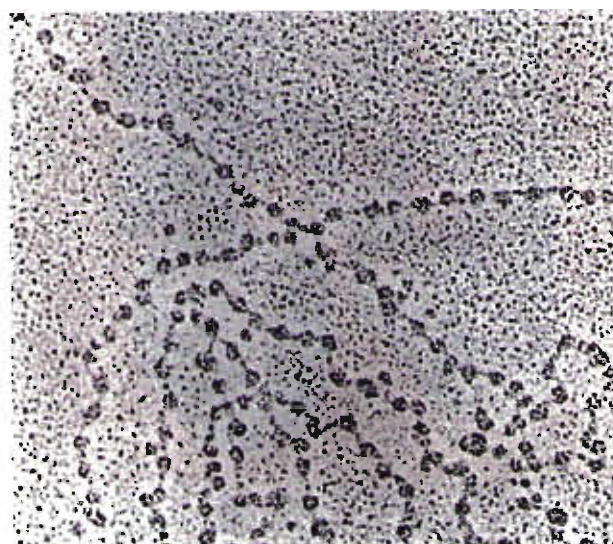


FIGURA 12-9. Uno de los primeros experimentos que indicó que la cromatina posee organización estructural repetitiva. Se trataron grupos aislados con DNA endonucleasa inespecífica, y a continuación se aisló el DNA y se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida. Las tres porciones de gel mostraron los patrones de DNA extraído luego de tratamiento de los núcleos durante 40 minutos (gel de la izquierda), 60 min (gel de enmedio) u 80 minutos (gel de la derecha). El DNA liberado por la digestión enzimática se encuentra en fragmentos de tamaño definido cuyo peso molecular son múltiplos del que se muestra en la banda 1. Con el tiempo de digestión más breve, los fragmentos que predominan son 4, 5 y 6 veces la longitud del fragmento más pequeño (monomérico). Con los tiempos de digestión más prolongados, se producen más de los fragmentos de los tamaños más pequeños. No se observan fragmentos más pequeños que los indicados en la banda 1 debido a que la longitud del DNA de este tamaño está protegida por su relación con histonas. (Cortesía de Dean A. Hewish y Leigh A. Burgoyne.)



(a)



(b)

FIGURA 12-10. Organización nucleosómica de la cromatina. a) Diagrama que muestra la estructura de una partícula central del nucleosoma y la molécula de histona H1 acompañante. La partícula central en sí consta de ocho moléculas de histonas centrales (dos de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4) y casi 1.8 vueltas (146 pares de bases) de DNA. b) Micrografía electrónica de la cromatina liberada del núcleo de un célula de *Drosophila*. Se puede ver que las partículas centrales del nucleosoma están conectadas por cortas cadenas de DNA de unión. (b: Cortesía de Oscar L. Miller, Jr.)

tra los cromosomas de un virus SV40 en el cual las partículas centrales nucleosómicas se distribuyen periódicamente, excepto en una región, dedicada a las histonas acompañantes. La ausencia de partículas nucleosómicas en este sitio, que al parecer contienen el origen para duplicación del cromosoma viral, se cree que es resultado del enlace de una molécula proteínica no histona. Por lo tanto, el enlace de la proteína no histona a un sitio específico dentro del DNA puede influir en la posición de las partículas nucleosómicas en la región adyacente del cromosoma. La capacidad del DNA para incurvarse alrededor del núcleo de la histona también es un factor en la posición de los nucleosomas. Los segmen-

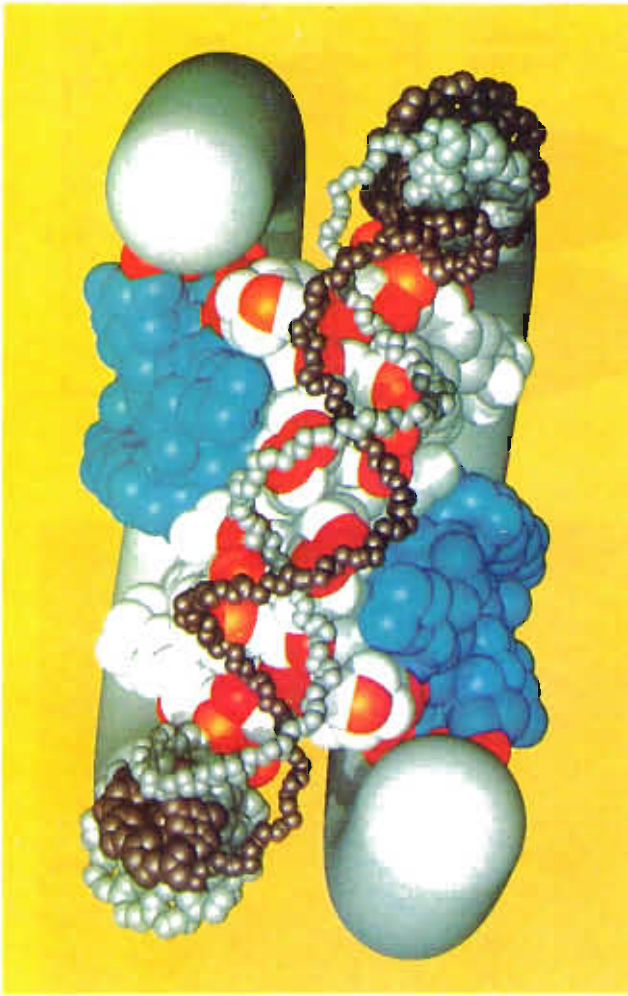


FIGURA 12-11. Modelo de las interacciones DNA-histona en un nucleosoma basado en datos de la cristografía de rayos X. Se ha eliminado el par de bases en la porción media del DNA dejando sólo el esqueleto, lo que permite observar las interacciones histona-DNA. Sus cargas positivas (puntos rojos y naranja) sobre las moléculas de histona coinciden con un patrón de cargas negativas situadas sobre el esqueleto de DNA que las rodea. Las histonas son azules y blancas; el DNA está representado por el cilindro gris externo y el esqueleto de doble hélice "en forma de cuentas". (Cortesía de Evangelos Moudrianakis, *Science* 263:327, 1994.)

tos de DNA ricos en A-T son más flexibles y más fáciles de inclinar que las regiones ricas en G-C. Como resultado, los nucleosomas tienden a formarse donde hay dispersión óptima entre regiones ricas en A-T y G-C, característica que disminuye la energía requerida para envolver el DNA alrededor de la histona octamérica. (Las regiones ricas en A-T tienden a presentarse donde el surco menor de la doble hélice se enfrenta a los núcleos centrales de las histonas, en tanto que las regiones ricas en G-C se observan donde el surco menor mira hacia afuera.) Como se verá más adelante en este capítulo, la posición de los nucleosomas puede conferir una relación importante a la expresión de un gen.

Al principio de esta sección nos preguntamos cómo un núcleo de 10 μm de diámetro puede albergar un DNA de

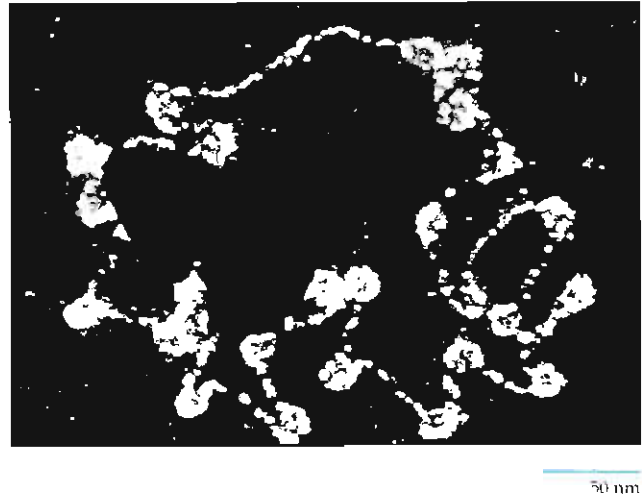


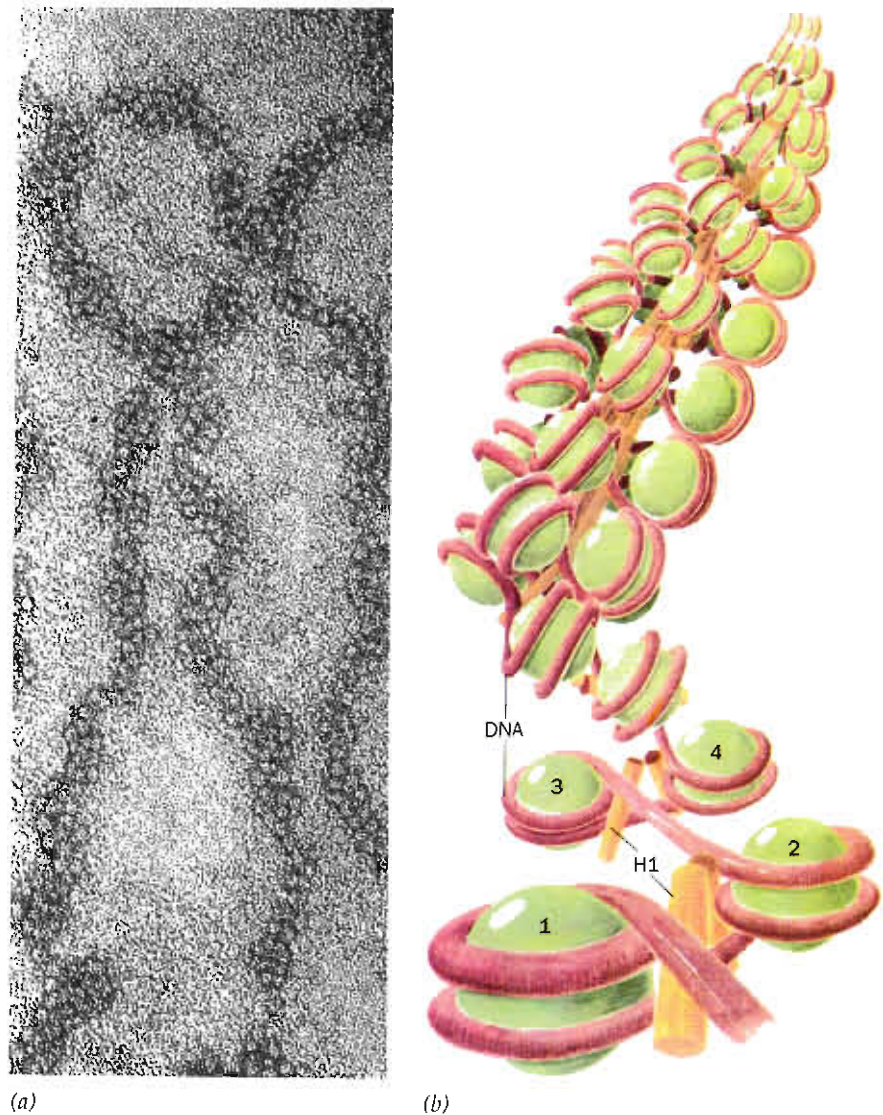
FIGURA 12-12. Demostración de la colocación de los nucleosomas sobre el DNA. Micrografía electrónica de un "minicromosoma" SV40 mostrando la hendidura característica (parte de arriba de la fotografía) en la distribución de las partículas centrales del nucleosoma. (Según S. Saragosti, G. Moyne y M. Yaniv, *Cell* 20:67, 1980; con permiso de Cell Press.)

200 000 veces su diámetro. La formación de los nucleosomas representa el primer paso importante en el proceso de empaquetamiento. Puesto que el espacio entre un nucleótido y otro es de 0.34 nm, los 200 pares de bases de un solo nucleosoma de 10 nm de diámetro se estiran casi 70 nm cuando se extienden por completo. Por consiguiente, se dice que la *proporción de empaquetamiento* del DNA de los nucleosomas es de casi 7:1.

Niveles más elevados de la estructura de la cromatina. Una molécula de DNA enrollada alrededor de las partículas centrales de un nucleosoma de 10 nm de diámetro es el más bajo nivel de organización de la cromatina. La cromatina no existe en su estado relativamente extendido de "cuentas de rosario" dentro de la célula. Las micrografías electrónicas de cortes a través del núcleo revelan numerosos "puntos pequeños" de unos 30 nm de diámetro que representan las fibras de cromatina cortadas en sección transversal. Cuando se prepara cromatina procedente de núcleos en presencia de iones bivalentes, se observa un filamento de espesor similar (30 nm) (fig. 12-13, a).

La estructura de los filamentos de 30 nm todavía es asunto de debate. En la figura 12-13, b, se muestra un modelo en el cual el filamento nucleosómico más delgado (10 nm) se enrolla para formar los filamentos más gruesos de orden más elevado. Este nivel adicional de organización de la cromatina incrementa la relación de empaquetamiento del DNA unas seis veces más. El mantenimiento de los filamentos de 30 nm depende de la interacción entre moléculas de histona H1 de los nucleosomas vecinos. Si las moléculas H1 se extraen selectivamente, los filamentos más gruesos de cromatina se desenrollan para formar los más delgados, las "cuentas de rosario" más extendidas. La adquisición de histona H1 restablece la estructura de orden más elevada.

FIGURA 12-13. Filamentos de 30 nm: es estructura de la cromatina de nivel más elevado. *a)* Micrografía electrónica de un filamento nativo de cromatina de 30 nm. *b)* Modelo del filamento de cromatina de 30 nm. El filamento está representado (de abajo hacia arriba) como si se hubiera formado con concentraciones crecientes de sal. (*a:* Cortesía de Barbara Hamkalo J.B. Rattner.)



Se cree que el siguiente nivel de empaquetamiento de las moléculas de DNA dentro del núcleo ocurre cuando los filamentos de cromatina de 30 nm se organizan en una serie de asas amplias superenrolladas. Se estima que cada asa contiene entre 10 y 150 kilobases (kb) de DNA y que está unida en su base a proteínas específicas, incluyendo una topoisomerasa tipo II que presumiblemente regula el grado de superenrollamiento del asa de DNA. Sería de esperar que la topoisomerasa desenrede las moléculas que el DNA de una asa hubiera enredado. Las asas de DNA pueden actuar para dividir el genoma en "dominios" que contengan un solo gen o un pequeño conjunto de genes enlazados expresados por un mecanismo regulador común. Con asas de tamaño promedio de 50 kb, un conjunto haploide de cromosomas humanos contiene casi 60 000 asas; este es el mismo orden de magnitud del número de genes que se cree contiene el genoma humano.

Normalmente, las asas de fibras de cromatina se dispersan dentro del núcleo y no es posible observarlas, pero

su presencia se puede revelar en ciertas circunstancias. Por ejemplo, cuando se tratan cromosomas mitóticos aislados con reactivos que extraen las histonas, se puede observar que el DNA libre de histona se extiende hacia afuera a partir de un armazón de proteínas que forma asas (que constan de proteína no histona) (fig. 12-14, *a*). Pueden observarse asas de tipo similar en la interfase de los cromosomas politenos de células de insectos (fig. 10-7) y en los cromosomas *lampbrush* meióticos de oocitos de anfibios (fig. 12-14, *b*), lo que indica que no son simples peculiaridades de cromosomas mitóticos.

Los cromosomas mitóticos representan la etapa última del empaquetamiento de la cromatina (fig. 12-14, *a*); un cromosoma mitótico de $1\ \mu\text{m}$ de longitud típicamente contiene casi 1 cm de DNA. Este empaquetamiento tiene lugar mediante un proceso todavía mal comprendido que se acompaña de la fosforilación de casi todas las moléculas de histona H1 en cada uno de los cinco residuos serina distintos dentro de la molécula.

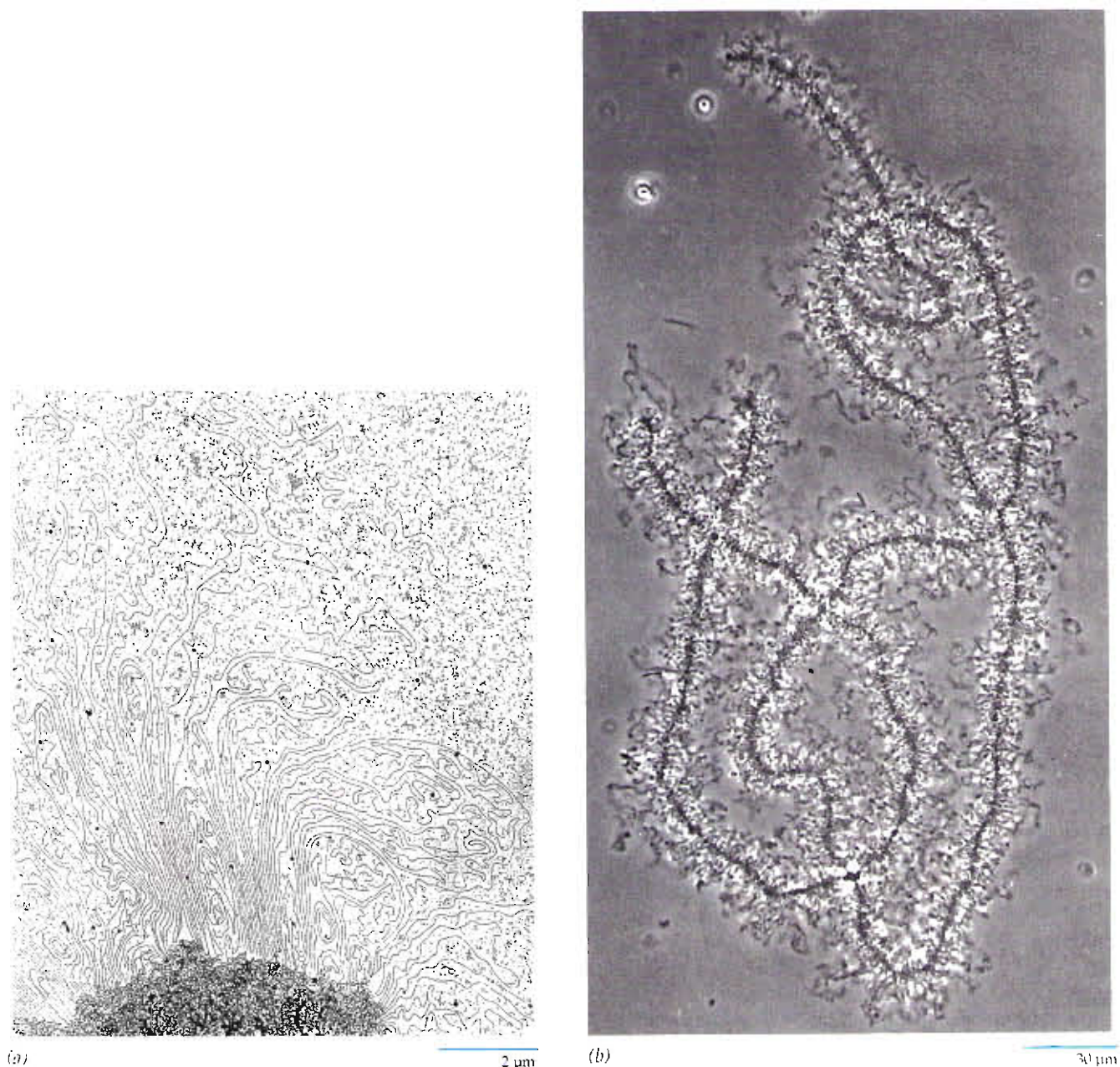


FIGURA 12-14. Asas de cromatina: estructura de la cromatina de nivel más elevado. *a)* Micrografía electrónica de un cromosoma mitótico reducido de histona que muestra que las asas de DNA se fijan en su base a un molde residual de proteínas. *b)* En esta micrografía electrónica también se observa el dominio de cromatina en forma de asas de un cromosoma en forma de mecha aislado de un oocito de anfibio. (*a*: Según James R. Paulson y U.K. Laemmli, Cell 12:823, 1977; con permiso de Cell Press; *b*: cortesía de Joseph G. Gall.)

En la figura 12-15 se muestra una revisión de los diferentes niveles de organización de la cromatina desde el filamento nucleosómico hasta un cromosoma mitótico.

Heterocromatina y eucromatina

Luego de concluir la mitosis, la mayor parte de la cromatina que compone los cromosomas mitóticos altamente empaquetados se dispersa, y regresa a su condición difusa de la interfase. Sin embargo, en la mayor parte de las células casi

10% del material cromosómico permanece en forma condensada compacta durante la interfase (esta cromatina condensada se observa en la periferia del núcleo de la figura 12-1, *a*). La cromatina que permanece condensada durante la interfase se denomina **heterocromatina**, para distinguirla de la **eucromatina**, que vuelve al estado disperso. Cuando se administra a las células un precursor de RNA marcado con algún isótopo radiactivo, como la ^3H -uridina, y posteriormente se fija, secciona y se practica autorra-

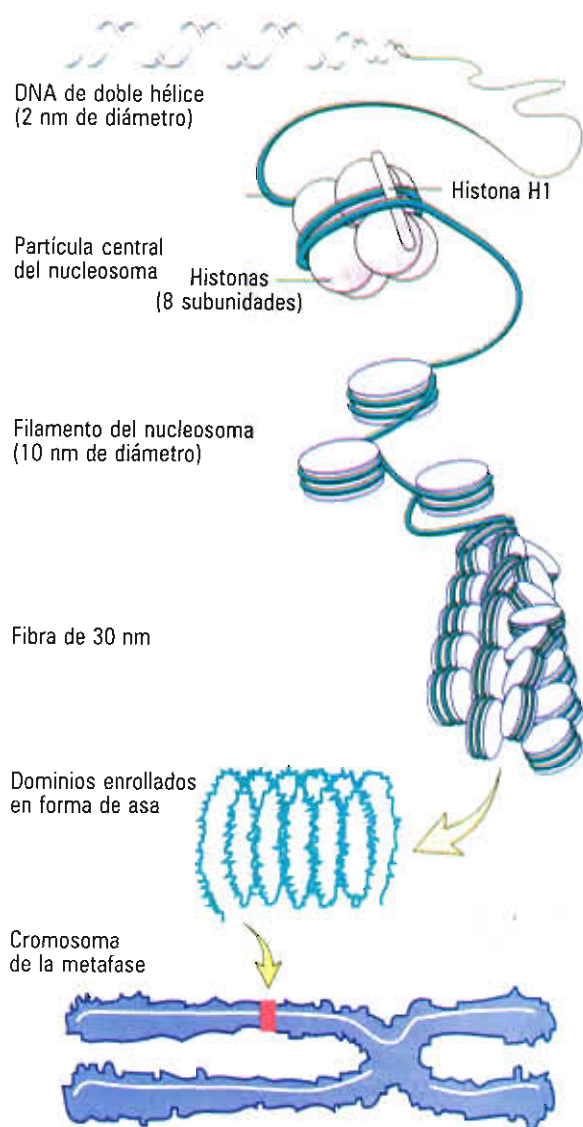


FIGURA 12-15. Niveles de organización de la cromatina. Las moléculas desnudas de DNA se encuentran rodeadas por histonas para formar nucleosomas, que representan el nivel más bajo de organización de la cromatina. Los nucleosomas se organizan en filamentos de 30 nm, que a su vez lo hacen en dominios en forma de asa. Cuando las células se preparan para la mitosis, las asas se enrollan aún más para formar fibras visibles dentro de los cromosomas mitóticos (fig. 14-13, a).

diografía en dichas células, los grumos de heterocromatina permanecen sin marca radiactiva, lo que indica que tienen poco o nada que ver con la actividad de la transcripción.

La heterocromatina se divide en dos categorías, **heterocromatina constitutiva** y **heterocromatina facultativa**, según su permanencia en estado compacto. La heterocromatina constitutiva permanece en estado condensado en todas las células y en todo momento, y por lo tanto representa al DNA permanentemente silencioso. En células de mamíferos, la masa de la heterocromatina constitutiva se sitúa den-

tro del centrómero de cada cromosoma y alrededor del mismo (analizado más adelante), y en unos pocos sitios seleccionados, como el brazo distal del cromosoma Y en mamíferos machos. En muchas plantas, los extremos de los cromosomas (telómeros) también contienen bloques de heterocromatina constitutiva. El DNA de heterocromatina constitutiva consta principalmente de secuencias altamente repetidas (pág. 406) y al parecer está desprovisto de genes que codifican proteína. En realidad, cuando los genes normalmente activos se desplazan a una posición adyacente a la heterocromatina (cuando el cambio de posición es resultado de transposición o translocación), tienden a inactivarse por sí mismos, fenómeno conocido como *efecto de posición*. Se cree que la heterocromatina contiene elementos cuya influencia puede propagarse hacia afuera cierta distancia, afectando el estado fisiológico de los genes cercanos.

A diferencia de la variedad constitutiva, la heterocromatina facultativa es una cromatina específicamente inactivada durante ciertas fases de la vida de un organismo. Se puede observar un ejemplo de heterocromatina facultativa al comparar las células de mamífero hembra con las del macho. Las células del macho tienen un pequeño cromosoma Y y un cromosoma X mucho mayor. Puesto que los cromosomas X y Y tienen muy pocos genes en común, los machos sólo tienen una copia sencilla de los genes transportados en los cromosomas sexuales. Aunque las células de las hembras contienen dos cromosomas X, sólo uno de este par presenta actividad de transcripción. El otro cromosoma X permanece condensado como un grumo heterocromático (fig. 12-16, a), denominado *corpúsculo Barr* por el investigador que lo descubrió en 1949. Se cree que la formación de un corpúsculo de Barr es un mecanismo para garantizar que las células de hembras y machos tengan el mismo número de cromosomas X activos, y por lo tanto sintetizan cantidades equivalentes de los productos codificados por los genes unidos al cromosoma X.

Inactivación X. En 1961, la genetista inglesa Mary Lyon propuso que en todas las células de los mamíferos hembra ocurre heterocromatización de un cromosoma X en las etapas tempranas del desarrollo embrionario. Este proceso se denomina *inactivación X* y posteriormente se demostró que tiene lugar en el embrión cerca del momento de la gastrulación. La inactivación X en el embrión es un proceso al azar en el sentido de que el cromosoma X derivado del padre y el cromosoma X derivado de la madre tienen igual probabilidad de ser inactivados en *cualquier célula determinada*. Por consiguiente, el X paterno se puede inactivar en una célula del embrión y el X materno puede inactivarse en la célula vecina. Sin embargo, a partir de ese momento, el mismo cromosoma X será inactivo en todos los descendientes de esa célula particular. La reactivación del segundo cromosoma X ocurre en las células germinales antes del inicio de la meiosis. En consecuencia, ambos cromosomas X son activos durante la oogénesis, y todos los gametos reciben un cromosoma X eucromático.

Puesto que los cromosomas X materno y paterno pueden contener alelos diferentes para la misma característica, las hembras adultas en cierto sentido son *mosaicos genéticos*, debido a que diferentes alelos funcionan en distintas células. El mosaicismo del cromosoma X se refleja en los par-

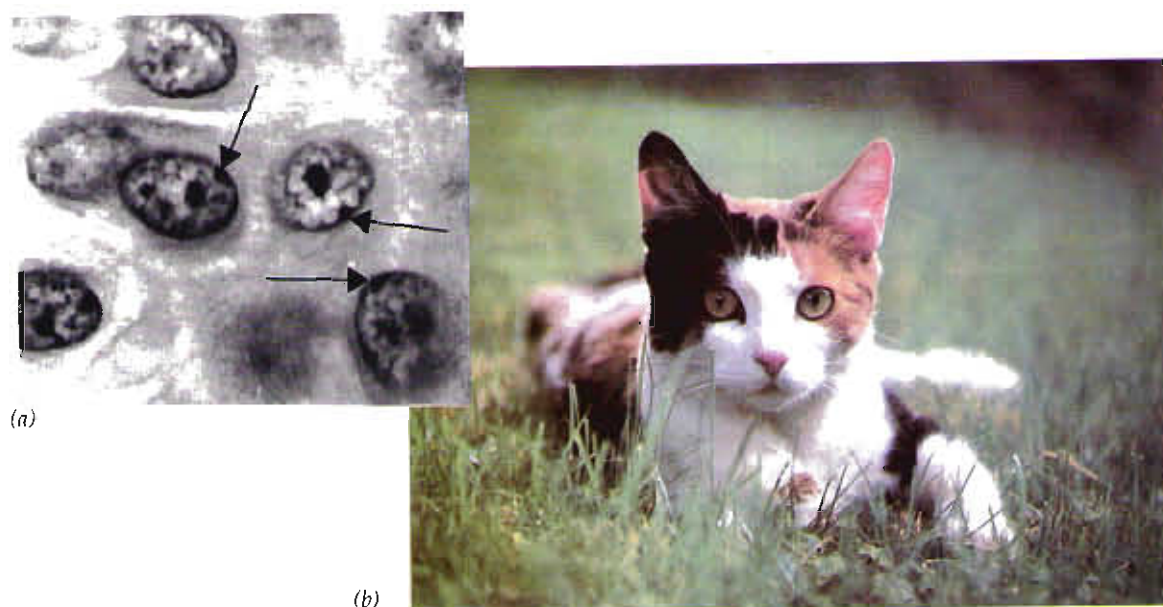


FIGURA 12-16. Cromosoma X inactivo: ejemplo de heterocromatina facultativa. *a)* El cromosoma X inactivado en el núcleo de una célula de mujer aparece como estructura heterocromática teñida de color oscuro, denominada corpúsculo de Barr (flechas). *b)* Gato manchado. La inactivación al azar de cualquiera de los cromosomas X en células diferentes durante el desarrollo embrionario temprano genera un mosaico de parches de tejidos. Cada parche contiene a los descendientes de una célula presente en el embrión en el momento de la inactivación. Estos parches son visualmente evidentes en los gatos manchados, que poseen un alelo por cada mancha de color negro residente en uno de los cromosomas X y un alelo por cada mancha de color amarillo sobre el otro X. Esto explica por qué razón los gatos machos manchados prácticamente no existen, puesto que en el macho todas las células tienen el mismo alelo para las manchas de color. (*a:* Cortesía de Murray L. Barr; *b:* según Jean Pragen/Tony Stone Worldwide.)

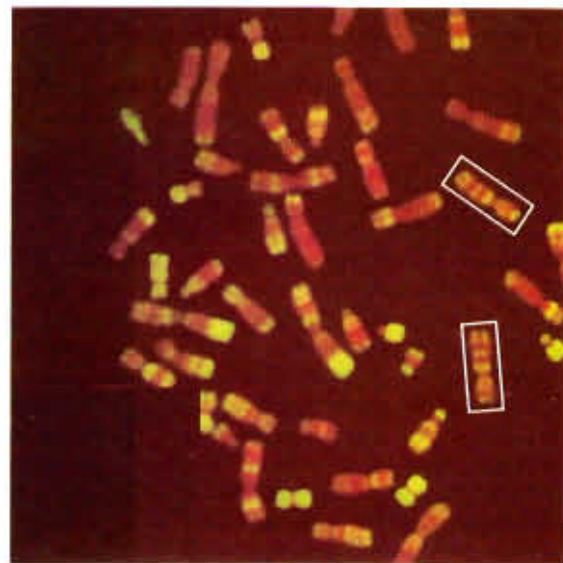
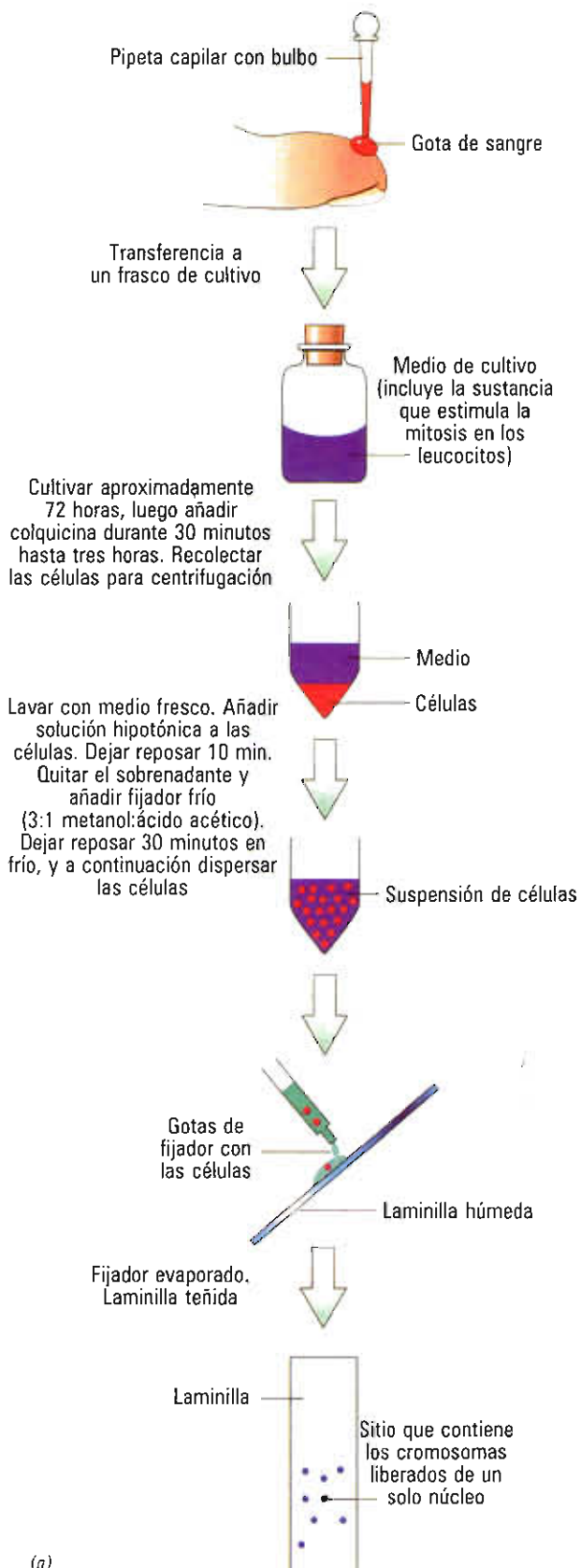
ches de color del pelaje de algunos mamíferos, incluyendo los gatos manchados (fig. 12-16, *b*). En el hombre, los genes de pigmentación no se localizan en el cromosoma X, de allí la ausencia de “mujeres manchadas”. Sin embargo, el mosaicismo se puede demostrar en mujeres debido a inactivación X. Por ejemplo, cuando se hace incidir un estrecho rayo de luz roja o verde en los ojos de una mujer portadora heterocigota de *ceguera a los colores rojo y verde*, se pueden observar parches de células retinales con visión defectuosa para el color dispersas entre parches de células con visión normal.

El mecanismo causante de la inactivación X ha sido foco de atención desde una publicación, en 1992, en la que se sugirió que la inactivación la inicia una molécula de RNA, en vez de una proteína, transcrita de uno de los genes (denominado *Xist*) localizado en un cromosoma X por lo demás *inactivo*. (El gen homólogo sobre el cromosoma X activo no se transcribe, lo que constituye un caso raro donde se expresa una porción heterocromatizada del genoma.) Este dato, junto con otros más, ha generado la idea de que las moléculas de RNA pueden actuar directamente como reguladores de genes, lo que representa una función previamente no descubierta del RNA. Los biólogos siempre han pensado que la macromolécula del RNA es primordial como elemento que contiene información, pero ahora se anticipan nuevos papeles para el RNA y algunos apenas están surgiendo (véase también el análisis del control de la traducción en la página 529).

Estructura del cromosoma mitótico

El estado disperso de la cromatina durante la interfase de la célula favorece la duplicación y transcripción del DNA. Por lo contrario, la cromatina de una célula mitótica se encuentra en su estado más altamente condensado, lo que favorece la dotación de un “paquete” íntegro de DNA a cada célula hija. Los cromosomas mitóticos han demostrado gran utilidad para los biólogos y también para los médicos, debido a que contienen un “juego completo” del material genético de una célula y se pueden visualizar con facilidad mediante técnicas sencillas.

Quando un cromosoma sufre condensación durante la profase mitótica, adopta una forma distinta y predecible determinada principalmente por la longitud de la molécula de DNA en ese cromosoma y la posición del centrómero (véase más adelante). Los cromosomas mitóticos de una célula en división pueden visualizarse mediante la técnica mostrada en la figura 12-17, *a*. En esta técnica se rompe cada una de las células y los cromosomas mitóticos de un solo núcleo se colocan y fijan a la superficie de una laminilla sobre una área muy pequeña (fig. 12-17, *b*). Cuando se cortan los cromosomas individuales en una fotografía de este tipo, se pueden formar pares homólogos (23 en el ser humano) y exhibir como un **cariotipo**, en el cual los homólogos se ordenan según su tamaño decreciente, como se muestra en la figura 12-17, *c*. Las preparaciones de cromosomas mitóticos se efectúan de manera sistemática a partir de cultivos de células sanguíneas y se emplean para descubrir individuos



(b)



(c)

FIGURA 12-17. Cromosomas mitóticos y cariotipos humanos. a) Procedimiento empleado para obtener preparaciones de cromosomas mitóticos a partir de leucocitos de sangre periférica para observar al microscopio. b) Fotografía de un grupo de cromosomas mitóticos tomado del núcleo de una sola célula humana en etapa de división. Este conjunto de 46 cromosomas diploides duplicados se tiñó con colorante de crina-crina que confiere a los cromosomas un patrón de bandas. Las dos cromátidas que constituyen cada cromosoma pueden distinguirse entre sí; los cuadros indican un par de cromosomas homólogos. c) Cromosomas de un varón dispuestos para formar un cariotipo. Los cariotipos se preparan a partir de fotografías de cromosomas extraídos de un solo núcleo. Cada cromosoma se recorta de la fotografía y se hace coincidir con su par homólogo según su tamaño, como se muestra en la figura. (b: Según R. Vernon/Phototake, c: según CNRI/Science Photo Library/Photo Researchers.)

LA PERSPECTIVA HUMANA

Aberraciones cromosómicas

Además de las mutaciones que alteran la información contenida en un solo gen, los cromosomas pueden sufrir alteraciones más extensas que ocurren con mayor frecuencia durante la división celular. Se pueden perder pedazos de un cromosoma o intercambiar segmentos entre diferentes cromosomas. Puesto que estas **aberraciones cromosómicas** ocurren después de la rotura de los cromosomas, su tasa aumenta por exposición a los agentes que dañan el DNA, como infecciones virales, rayos X o sustancias químicas reactivas. Además, los cromosomas de algunos individuos contienen sitios "frágiles" particularmente susceptibles a rotura. Las personas con ciertas enfermedades hereditarias raras, como el síndrome de Bloom, la anemia de Fanconi, y la ataxia telangiectasia, poseen cromosomas inestables que muestran una gran tendencia a la rotura.

Las consecuencias de una aberración cromosómica dependen de los genes afectados y del tipo de célula en la cual ocurre. Si la aberración se presenta en una célula somática (no reproductiva), las consecuencias en general son mínimas, pues de ordinario sólo unas cuantas células del cuerpo están afectadas. Sin embargo, en raras ocasiones una célula portadora de una aberración puede transformarse en célula maligna, la cual puede crecer hasta formar un tumor canceroso.

Las aberraciones cromosómicas que ocurren durante la meiosis, en particular como resultado del entrecruzamiento anormal, pueden transmitirse a la siguiente generación. Cuando se hereda una aberración cromosómica a través de un gameto, todas las células de los descendientes mostrarán la aberración y el individuo en general no sobrepasa del desarrollo embrionario. Hay varios tipos de aberraciones cromosómicas, incluyendo:

- **Inversiones.** A veces un cromosoma se rompe en dos sitios y el segmento situado entre los puntos de rotura se vuelve a fijar dentro del cromosoma en orden inverso. Esta aberración se denomina **inversión**. Por lo menos 1% de los humanos son portadores de una inversión, la cual puede detectarse durante la elaboración de cariotipos cromosómicos. Puesto que un cromosoma que posee una inversión de ordinario contiene todos los genes de un cromosoma normal, el individuo no se ve afectado adversamente. Sin embargo, si una célula con inversión de un cromosoma sufre meiosis, el cromosoma aberrante no puede formar un par apropiado con su homólogo normal debido a las diferencias en el orden de sus genes. En estos casos, la formación de un par cromosómico de ordinario se acompaña de la formación de un asa (fig. PH 12-1). Si ocurre entrecruzamiento en el asa, según se muestra en la figura, los gametos generados por meiosis tendrán una copia adicional de ciertos genes (duplicación) o carecerán de dichos genes (supresión). Cuando un gameto que contiene un cromosoma alterado se funde con un gameto normal durante la fertilización, el cigoto resultante muestra desequilibrio cromosómico y por lo general no es viable.
- **Translocaciones.** Cuando todos los pedazos o uno solo de un cromosoma se fija a otro cromosoma, la aberración se denomina **translocación** (fig. PH 12-2). Igual que las inversiones, una translocación en una célula somática por lo general tiene poco efecto sobre las funciones de dicha célula o de su progenie. Sin embargo, ciertas translocaciones aumentan la probabilidad de malignización de la célula.

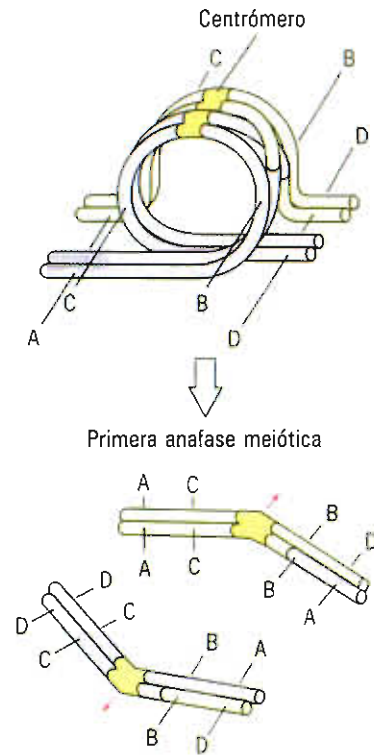


FIGURA PH 12-1. Efecto de la inversión. El entrecruzamiento entre un cromosoma normal (azul) y uno que contiene una inversión (verde) de ordinario se acompaña de la formación de un asa. Los cromosomas que resultan de este entrecruzamiento contienen duplicaciones y deficiencias, las cuales se muestran en los cromosomas en la primera división meiótica en la parte inferior de la figura.

El ejemplo mejor estudiado es el **cromosoma Filadelfia**, que se observa en las células malignas (pero no en las células normales) de individuos con ciertas formas de leucemia. El cromosoma Filadelfia, así denominado por la ciudad en la cual se descubrió en 1960, es una versión acortada del cromosoma humano número 22. Durante años se pensó que el segmento perdido representa una simple supresión,



FIGURA PH 12-2. Una translocación. Micrografía que muestra un conjunto de cromosomas humanos en los cuales el cromosoma 12 (verde) ha intercambiado pedazos con el cromosoma 7 (rojo). Los cromosomas afectados se hicieron fluorescentes mediante hibridación *in situ* con un gran número de fragmentos de DNA específicos para cada uno de los dos cromosomas implicados. El uso de estas "tinciones" hace muy evidente el intercambio de piezas de un cromosoma con otro. (Cortesía de Lawrence Livermore National Laboratory, según una técnica desarrollada por Joe Gray y Dan Pinkel.)

pero con el perfeccionamiento de las técnicas para observar cromosomas, se observó que la pieza faltante del gen se transloca a otro cromosoma (número 9). El cromosoma número 9 contiene un gen que codifica una proteína que participa en la proliferación celular. Como resultado de la translocación, un extremo pequeño de esta proteína se sustituye por casi 600 aminoácidos extra codificados por un gen presente en el pedazo translocado del cromosoma número 22. Esta nueva proteína excesivamente alargada al parecer retiene la actividad catalítica de la versión original, pero ya no está sometida a los mecanismos reguladores normales de la célula.

Igual que en las inversiones, las translocaciones causan problemas durante la meiosis. Un cromosoma alterado por una translocación tienen un contenido genético diferente en comparación con su homólogo. Como resultado, los gametos formados por meiosis contienen copias extra de los genes o carecen de los mismos. Se ha demostrado que las translocaciones

desempeñan un papel importante en la evolución, generando cambios a gran escala que a veces constituyen el punto de arranque de líneas evolutivas separadas que se ramifican a partir de un ancestro común. Durante nuestra historia evolutiva reciente tal vez ocurrió un incidente genético de esta naturaleza.

La comparación de los 23 pares de cromosomas de las células humanas contra los 24 pares de cromosomas en las células de chimpancés, gorilas y orangutanes revela una similitud notable. El examen atento de los dos cromosomas de los simios que no tienen contraparte en el ser humano revela que juntos equivalen, banda por banda, al cromosoma humano número 2 (fig. PH 12-3). En algún punto durante la evolución de los seres humanos, un cromosoma entero fue translocado a otro, y mediante la fusión de los dos cromosomas se formó uno solo, reduciendo el número haploide de 24 a 23.

- **Supresiones.** Cuando se pierde una parte de un cromosoma ocurre una **supresión**. Como se hizo notar anteriormente, cuando uno de los gametos es producto de meiosis anormal se forman cigotos que contienen supresión cromosómica. La pérdida de una porción de un cromosoma de ordinario provoca la ausencia de genes críticos, generando consecuencias graves, incluso si el cromosoma homólogo del individuo es normal. La mayor parte de los embriones humanos que contienen supresiones significativas no terminan su de-

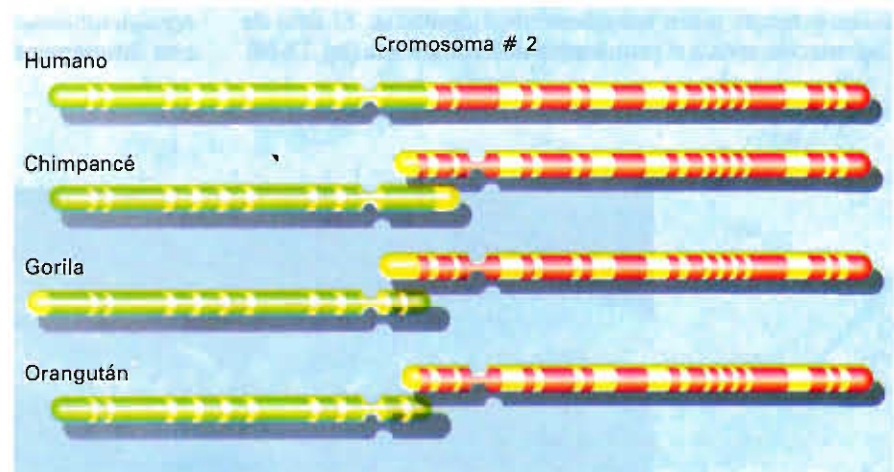


FIGURA PH 12-3. Translocación y evolución. Si los dos únicos cromosomas de los monos que no tienen contraparte en el ser humano se "fusionan", coinciden con el cromosoma humano número 2, banda por banda.

sarrollo, y los embriones que lo logran presentan varias malformaciones. La primera correlación entre una enfermedad humana y la supresión cromosómica fue establecida en 1963 por Jerome Lejeune, genetista francés que anteriormente había descubierto la base cromosómica del síndrome de Down. Lejeune descubrió que un bebé nacido con varias malformaciones faciales y desarrollo anormal de la laringe (voz en ca-

jón) carecía de una parte del cromosoma 5. Un defecto en la laringe del niño le provocaba un llanto parecido a los ruidos emitidos por un gato en agonía. Por consiguiente, el científico denominó al trastorno **síndrome cri du chat** que significa síndrome de aullido de gato.

- **Duplicaciones.** Cuando se repite una porción del cromosoma ocurre una **duplicación**. El papel de las duplicaciones en la formación

de familias de múltiples genes se analizó en la página 410. Duplicaciones cromosómicas más sustanciales generan una situación en la cual se encuentran tres copias de un gen en vez de las dos copias normalmente presentes (situación denominada *trisomía parcial*). Las actividades celulares son muy sensibles al número de copias de genes, y por lo tanto las copias extra de genes pueden tener efectos nocivos graves.

con anomalías cromosómicas. Según se analiza en *La perspectiva humana*, en este capítulo, con dicha técnica se puede determinar la presencia de cromosomas extra, la ausencia de los mismos o los burdamente alterados.

Los cromosomas que se muestran en la figura 12-17, *b*, fueron teñidos con quinacrina, un colorante fluorescente que confiere a los cromosomas aspecto de bandas cruzadas. El patrón de estas **bandas Q**, como se les denomina, es característico para cada cromosoma de una especie y suministra una base para identificar cromosomas con rapidez y comparar los cromosomas de una especie con la siguiente (fig. PH 12-3). También se pueden descubrir alteraciones cromosómicas relativamente sutiles, como cambios en el patrón de bandas. Las bandas Q más brillantes típicamente contienen secuencias de DNA repetitivas ricas en A-T, y menor contenido de genes que codifican proteínas.

Centrómeros. Podemos notar que cada cromosoma mostrado en la figura 12-17 tiene un sitio donde las superficies externas están notablemente indentadas. El sitio de indentación señala el **centrómero** del cromosoma (fig. 12-18).

Anteriormente se mencionó que los centrómeros de los cromosomas contienen heterocromatina constitutiva. Los centrómeros de los cromosomas humanos tienen una secuencia de casi 170 nucleótidos de largo (denominada DNA α satélite) dispuestos en serie y repetidos entre 2 000 y 30 000 veces por cada centrómero. El DNA centromérico se enlaza a proteínas específicas, incluyendo las que sirven como sitios de fijación para los microtúbulos que separan los cromosomas durante la división celular (estudiado con detalle en la sección 14-2).

Telómeros. Los dos extremos de la molécula de DNA que constituye cada cromosoma contienen un tramo poco común de secuencias repetidas denominado **telómero**, que forma un “casquete” en cada extremo del cromosoma. En el ser humano, los telómeros contienen la secuencia TTAGGG repetida miles de veces (fig. 12-19, *a*). A diferencia de la mayor parte de las secuencias repetidas que varían considerablemente de una especie a otra, incluso en especies íntimamente relacionadas, la misma secuencia obser-



FIGURA 12-18. Cada cromosoma mitótico posee un centrómero cuyo sitio está marcado por una indentación distinguible. Gammagrafía electrónica de un cromosoma mitótico. El centrómero (C) aloja secuencias cortas altamente repetidas de DNA (DNA satélite) y una estructura proteínica denominada cinetocoro, que es el sitio de fijación de los microtúbulos del huso durante la mitosis y la meiosis estudiadas en el capítulo 14). (Según Jerome B. Rattner, *Bioessays* 13:51, 1991.)

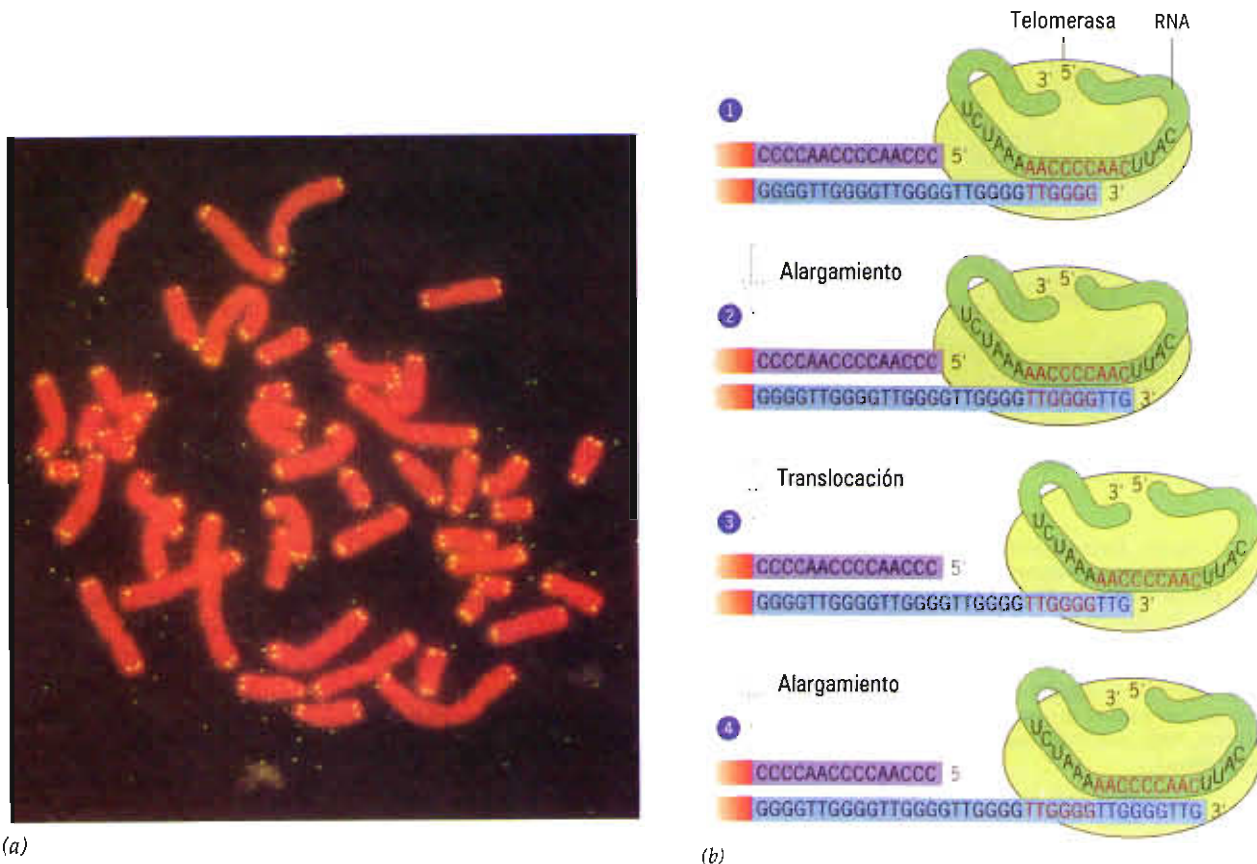


FIGURA 12-19. Telómeros. a) Hibridación *in situ* de una sonda DNA que contiene la secuencia TTAGGG, que localiza a los telómeros de cromosomas humanos. b) Mecanismo de acción de la telomerasa. La enzima contiene una molécula RNA complementaria del extremo 3' de la cadena. El RNA se une a esta región sobresaliente de DNA (paso 1) y a continuación sirve como plantilla para añadir unidades teloméricas repetidas (paso 2). Conforme se sintetiza DNA, el RNA telomérico se desliza a lo largo de la cadena alargándose (paso 3) y sirve como plantilla para la incorporación de nucleótidos adicionales (paso 4). A continuación otra DNA polimerasa sintetiza a la segunda cadena. (a: Según J. Meyne, en R.P. Wagner, *Chromosomes: A Synthesis*, Wiley, 1993; b: según C.W. Greider y E.H. Blackburn, *reimpreso con permiso de Nature* 337:336, 1989; copyright 1993 Macmillan Magazines Limited.)

vada en los telómeros humanos se encuentra en todos los vertebrados hasta ahora examinados. Otros organismos, como los protozoarios y levaduras, poseen telómeros con secuencias diferentes, pero igual que en los vertebrados, una cadena es invariablemente rica en residuos de guanocina y la cadena complementaria en residuos de citosina. La cadena rica en G corre en dirección 5' a 3' hacia cada extremo del cromosoma y se extiende 12 a 15 nucleótidos más allá del extremo de la cadena rica en C. Como resultado del "desnivelamiento", la cadena rica en G forma un apéndice de DNA de una sola cadena en cada extremo del cromosoma. Esta disposición se mantiene de una generación de células a la siguiente por medio de una enzima especial denominada *telomerasa*, que puede añadir nuevas unidades repetidas al extremo 3' de la cadena rica en G (fig. 12-19, b). La telomerasa, cuyas propiedades fueron extensamente estudiadas por Elizabeth Blackburn y sus colegas, de la Universidad de California en San Francisco, es una transcriptasa inversa que ensambla DNA a partir de una plantilla de

RNA. La telomerasa es una enzima muy poco común en la cual el RNA que sirve como plantilla en realidad es un componente integral de la propia enzima. Las secuencias de los telómeros también sirven como sitios de enlace para varias proteínas específicas (fig. 12-20).

Los telómeros desempeñan papeles importantes: se requieren para la duplicación completa del cromosoma, protegen a los cromosomas contra las nucleasas y otras influencias desestabilizadoras, evitan que los extremos de los cromosomas se fusionen entre sí, y facilitan la interacción entre los extremos del cromosoma y la envoltura nuclear en ciertos tipos de células. Experimentos recientes sugieren nueva participación. Las células normales pueden dividirse sólo un número limitado de veces en cultivo antes que muestren signos de "envejecimiento" y por último la muerte. Se han propuesto varias causas para explicar esta observación. La más reciente es un acortamiento progresivo de los telómeros. El acortamiento de los telómeros ocurre debido a que la mayor parte de las células normales de mamíferos carecen

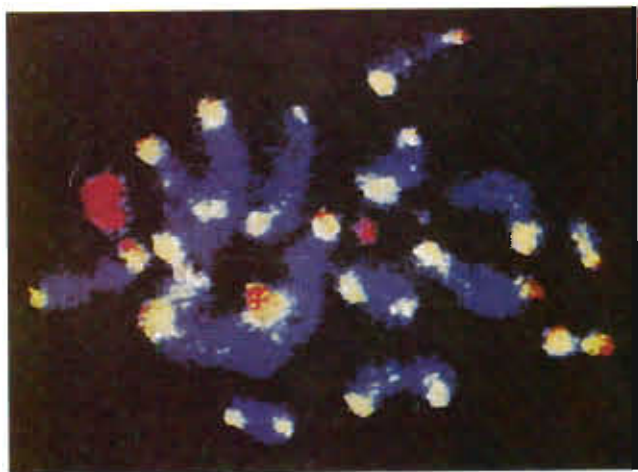
2 μm

FIGURA 12-20. Demostración experimental de que ciertas proteínas se enlazan específicamente al DNA telomérico. Estos cromosomas se prepararon a partir de núcleos meióticos de una célula de levadura y se incubaron con la proteína RAP1, la cual posteriormente fue localizada en los telómeros mediante un anticuerpo fluorescente antiRAP1. Las regiones en azul indican DNA teñido, las áreas amarillas representan el antiRAP1 marcado, y las áreas rojas muestran el RNA teñido con yoduro de propidio. (Según Franz Klein y cols. *J. Cell Biol.* 117:940, 1992; cortesía de Susan M. Gasser; con permiso de Rockefeller University Press.)

al parecer de telomerasa. A diferencia de las células normales, las células cancerosas no detienen su crecimiento en cultivo de células; se dice que son "inmortales". Uno de los factores que puede contribuir a la inmortalidad de las células malignas es la reactivación de la telomerasa, que mantiene la longitud de los telómeros de una generación a la siguiente. En realidad, estudios recientes demuestran que algunos tipos de cáncer humano poseen actividad de telomerasa no presente en sus contrapartes normales. Este dato motivó una búsqueda de inhibidores específicos de esta enzima con la esperanza de que puedan detener el crecimiento de algunos tumores.

El núcleo considerado como organelo organizado

Los biólogos celulares se apoyan principalmente en estudios bioquímicos para entender las actividades del núcleo. Aunque suministran gran cantidad de información, rompen cualquier tipo de estructura molecular ordenada que pudiera existir dentro del núcleo y dan la impresión de que este núcleo sólo es un "saco" de elementos dispuestos al azar. Sin embargo, muchos datos sugieren que el núcleo es en realidad un compartimiento altamente ordenado. Por ejemplo, las fibras de cromatina que constituyen una interfase determinada del cromosoma no se dispersan a través de todo el núcleo, como podría esperarse, sino que se concentran en un dominio específico que no se superpone extensamente con los dominios de otros cromosomas (fig.

12-21). Las interacciones entre los extremos de los cromosomas y la envoltura nuclear suministran otro medio de ordenar los cromosomas dentro del núcleo (fig. 12-22, a). Esta relación es más evidente durante la meiosis, cuando los cromosomas pueden extenderse radialmente hacia afuera de la envoltura nuclear formando un "ramillete" (fig. 12-22, b).

Desde hace varios decenios se sabe que el RNA ribosómico se sintetiza en un sitio particular dentro del nucléolo, pero se asumió que otros RNA, en particular el RNAm, se ensamblan a través de todo el núcleo. Sin embargo, hay suficientes pruebas de que los RNAm se sintetizan en un número restringido de sitios discretos dentro de cada núcleo. Cuando se identifican mediante sonda fluorescente marcada, los sitios de síntesis y procesamiento de precursores del RNAm aparecen como "manchitas" brillantes contra un nucleoplasma por lo demás no marcado (fig. 12-23). Cada una de las 20 a 50 "manchitas" observadas en determinado núcleo debe ser sitio de síntesis de diversas disposiciones de diferentes RNAm. Se piensa que los distintos componentes del núcleo deben estar ordenados en el compartimiento por la acción de una red compleja interactiva de filamentos que constituyen la matriz nuclear.

La matriz nuclear

Cuando se extraen núcleos aislados con detergentes no iónicos y concentración elevada de sal (p. ej., 2 M de NaCl) para

5 μm

FIGURA 12-21. Localización de un solo cromosoma en un núcleo en interfase. La micrografía muestra el núcleo de una célula HeLa sometido a doble marcado FISH (fluorescencia de hibridación *in situ*) para visualizar: 1) el sitio del gen distrofina, que se encuentra sobre el cromosoma X, y 2) la localización de todo el cromosoma X. La sonda enlazada al gen distrofina se localizó mediante un colorante fluorescente verde, en tanto que las sondas enlazadas a otras secuencias del cromosoma X se localizaron con un colorante fluorescente de color rojo naranja. Se observa que cada uno de los cromosomas homólogos X ocupa territorios restringidos dentro de los núcleos de la célula HeLa en vez de distribuirse homogéneamente a través de todo el núcleo. Las flechas indican los sitios donde se localiza el gen distrofina de cada homólogo. (Cortesía de Anette Kurz y Peter Lichter, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg.)

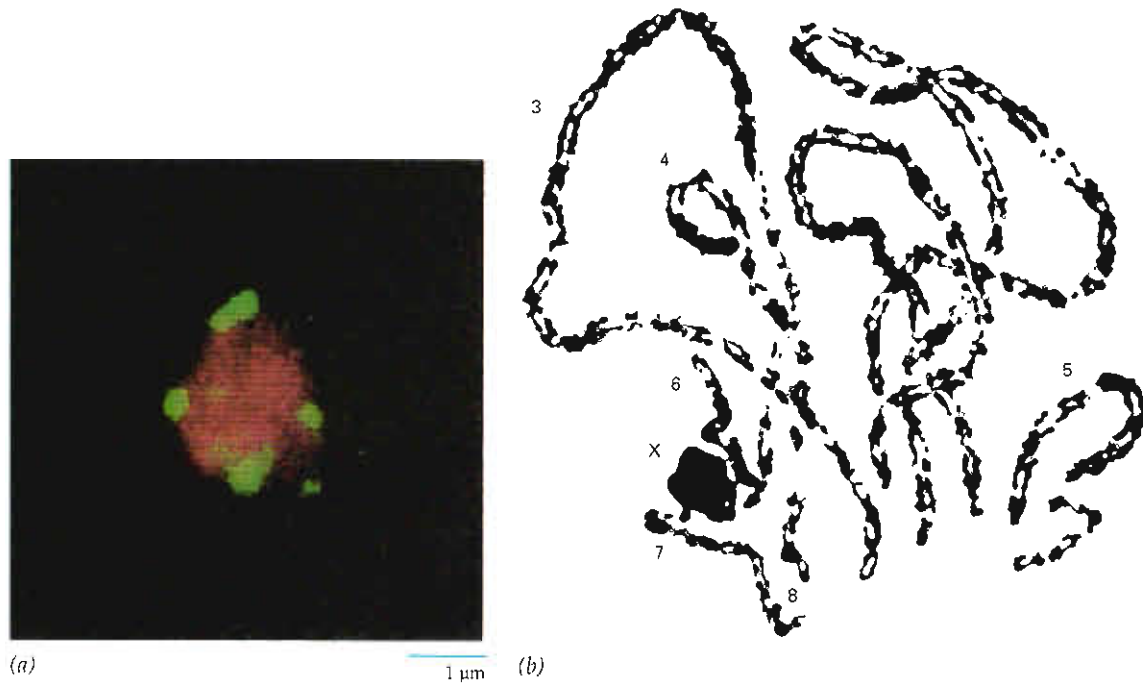


FIGURA 12-22. Demostración de la relación de los telómeros con la envoltura nuclear. *a)* Micrografía del núcleo de una levadura con tinción doble para DNA (fluorescencia roja) y para proteínas RAP1 (fluorescencia verde-amarilla), los cuales se unen específicamente a secuencias de DNA del telómero (fig. 12-20). La localización de las proteínas RAP1 en los grupos situados en la superficie interna de la envoltura nuclear sugiere una probable relación del DNA telomérico con la membrana nuclear interna. *b)* Cromosomas de una etapa de la profase meiótica del saltamontes macho en el cual cromosomas homólogos se asocian físicamente como parte de un bivalente. Los extremos de los bivalentes se disponen en un ramillete bien definido con sus regiones terminales agrupadas cerca de la superficie interna de la envoltura nuclear, hacia la base de la fotografía. (*a*): Cortesía de Thierry Laroche y Susan M. Gasser; *b*): cortesía de Bernard John, según B. John, *Meiosis*. Reimpreso con permiso de Cambridge University Press, 1990.)

eliminar lípidos y casi todas las proteínas histona y no histona de la cromatina, se observa el DNA como un halo que rodea un núcleo central nuclear residual (fig. 12-24, *a*). Si se digieren subsecuentemente las fibras de DNA con DNasa,

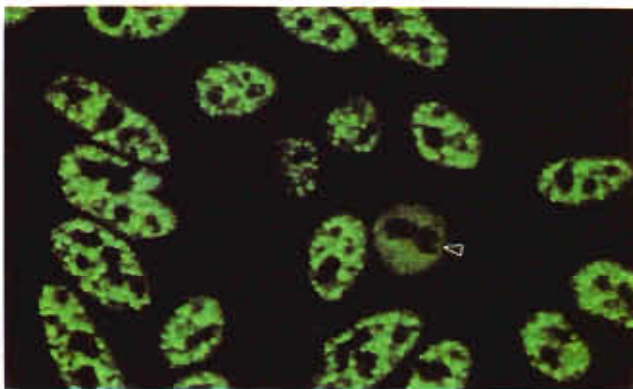
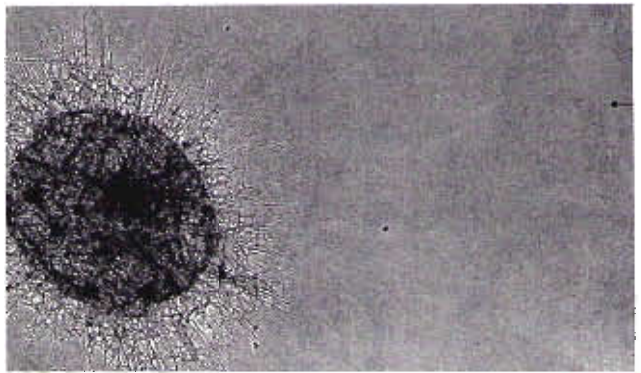


FIGURA 12-23. Demostración de que los factores de empalme de los precursores RNAm se organizan en un patrón moteado dentro de los núcleos en interfase. Se cree que una parte del patrón moteado comprende sitios de almacenamiento o de reensamblado para los factores de empalme, en tanto que otra parte representa sitios activos de transcripción. Al entrar en mitosis (cabeza de la flecha), los factores de empalme se redistribuyen difusamente por todo el citoplasma. (Cortesía de David L. Spector, Cold Spring Harbor Laboratory.)

la estructura que permanece posee la misma forma del núcleo original, pero está compuesta de una red de delgadas fibrillas que contienen proteínas entrecruzadas en forma de cierre a través del espacio nuclear (fig. 12-24, *b*). Esta red fibrilar insoluble se denomina **matriz nuclear**.

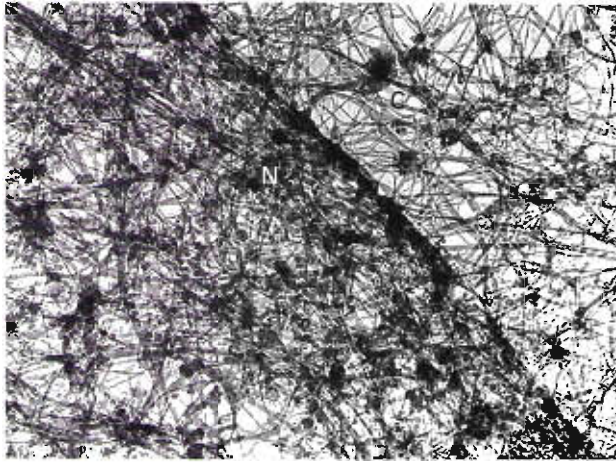
La matriz nuclear es algo más que un esqueleto para mantener la forma del núcleo o un molde sobre el cual se organizan las asas de cromatina (pág. 498); también sirve para anclar gran parte del mecanismo implicado en las diferentes actividades del núcleo, incluyendo transcripción, duplicación y procesamiento de RNA. Por ejemplo, cuando las células se incuban con RNA radiactivo o precursores de DNA durante un breve periodo, casi todos los ácidos nucleicos recién sintetizados se encuentran asociados a las fibrillas de la matriz nuclear.

La prueba más espectacular de la importancia de la matriz nuclear proviene de una serie de estudios efectuados en el laboratorio de Jeanne Lawrence en la Universidad de Massachusetts. Utilizando hibridación *in situ* con fluorescencia para identificar la localización de secuencias específicas de DNA o RNA (pág. 407), Lawrence y sus colaboradores encontraron que las moléculas de RNA transcritas a partir de un solo gen aparecen como rayas en una parte muy restringida del núcleo (fig. 12-25, *a*). Las rayas verdosas que se muestran en la figura 12-25, *a*, se deben a la presencia de varios cientos de moléculas precursoras de RNAm transcritas de un solo gen localizado cerca de un



(a)

5 µm



(b)

FIGURA 12-24. La matriz nuclear. *a)* Micrografía electrónica de un núcleo aislado en presencia de detergente y 2M de sal, que deja la matriz nuclear rodeada por un halo de asas de DNA. La flecha indica el límite externo de las asas de DNA. *b)* Micrografía electrónica de una parte del fibroblasto de ratón extraída con detergente y reducida de su cromatina y DNA mediante tratamiento con nucleasas y solución salina concentrada. Se observa que el núcleo (N) consta de una matriz filamentosa residual cuyos elementos terminan en el sitio de la envoltura nuclear. El citoplasma (C) contiene una matriz citoesquelética diferente cuya estructura se estudia en el capítulo 9. (*a*: Reimpreso con permiso de D.A. Jackson, S.J. McReady y P.A. Cook, *Nature* 292:553, 1981; copyright 1981 Macmillan Magazines Limited; *b*: según David G. Capco, Katherine M. Wan y Sheldon Penman, *Cell* 29:851, 1982; con permiso de Cell Press.)

extremo de la raya (la posición del gen está indicada por la flecha). La concentración de los transcritos en un foco tan definido sugiere que no son libres de difundir simplemente hacia afuera del DNA sobre el cual fueron transcritos, sino más bien son mantenidos en su sitio por algún componente estructural del núcleo conforme se procesan.

Cuando los núcleos, como el que se muestra en la figura 12-25, *a*, se extraen con detergentes y concentración elevada de sal, prácticamente todos los precursores RNAm recién transcritos permanecen asociados a la matriz nuclear residual. En realidad, las pistas fluorescentes de RNAm observadas antes de la extracción en un núcleo determinado permanecen en la misma posición precisa en ese núcleo

después de la extracción. Estos resultados sugieren fuertemente que los RNA recién sintetizados se asocian a elementos de la matriz nuclear. La orientación de las rayas sugiere que los RNA se desplazan desde sitios dentro del interior del núcleo donde se sintetizan a sitios más periféricos en el núcleo (fig. 12-25, *b*). Conforme los precursores RNAm se alejan del gen donde fueron sintetizados, el mecanismo de empalme de las células elimina los intrones de los transcritos. La orientación de la pista desde el interior nuclear hacia la periferia nuclear es coherente con un modelo en el cual la matriz nuclear ayuda a guiar a los RNA desde su sitio de transcripción hasta otro o a unos cuantos poros nucleares a través de los cuales pueden salir del núcleo.

12-2 Control de la expresión de genes en procariotes

Una célula bacteriana vive en contacto directo con su ambiente, que puede sufrir cambios espectaculares en composición química de un momento a otro. En determinado momento puede estar presente un compuesto particular, en tanto que otras veces dicho compuesto está ausente. Una ventaja selectiva evidente para estas células es utilizar sus recursos disponibles de la manera más eficiente, y los mecanismos que han evolucionado que les permiten responder a cambios específicos mediante la expresión de genes selectivos. Consideremos las consecuencias de transferir un cultivo de bacterias desde un medio mínimo a otro que contenga: 1) lactosa o 2) triptófano.

1. La lactosa es un disacárido (véase fig. 12-15) compuesto de glucosa y galactosa cuyo desdoblamiento oxidativo puede suministrar a la célula energía e intermediarios metabólicos. El primer paso en el desdoblamiento de esta molécula es la hidrólisis del enlace (unión β -galactósido) que junta los dos azúcares, reacción catalizada por la enzima β -galactosidasa. Cuando se cultivan estas células bacterianas en condiciones mínimas antes de transferirlas, las células no necesitan β -galactosidasa. En condiciones mínimas, una célula promedio contiene menos de cinco copias de enzima y una sola copia del RNAm correspondiente. La adición de lactosa al medio de cultivo produce un número casi 1 000 veces mayor de moléculas de β -galactosidasa dentro de las células en comparación con el número presente cuando las células se encontraban en el medio mínimo. La presencia de lactosa **indujo** la síntesis de esta enzima (fig. 12-26).
2. El triptófano es un aminoácido esencial. En ausencia de este compuesto en el medio de cultivo, la bacteria debe gastar cierta cantidad de energía para sintetizar triptófano y asegurar su disponibilidad para incorporarlo a las proteínas. Las células que crecen en ausencia de triptófano contienen las enzimas, y su correspondiente RNAm, necesarias para elaborar triptófano. Sin embargo, si este aminoácido súbitamente llega a estar disponible en el medio, las células ya no tienen que sintetizar su propio triptófano y en unos pocos minutos la producción de las enzimas de la vía del triptófano se detiene.

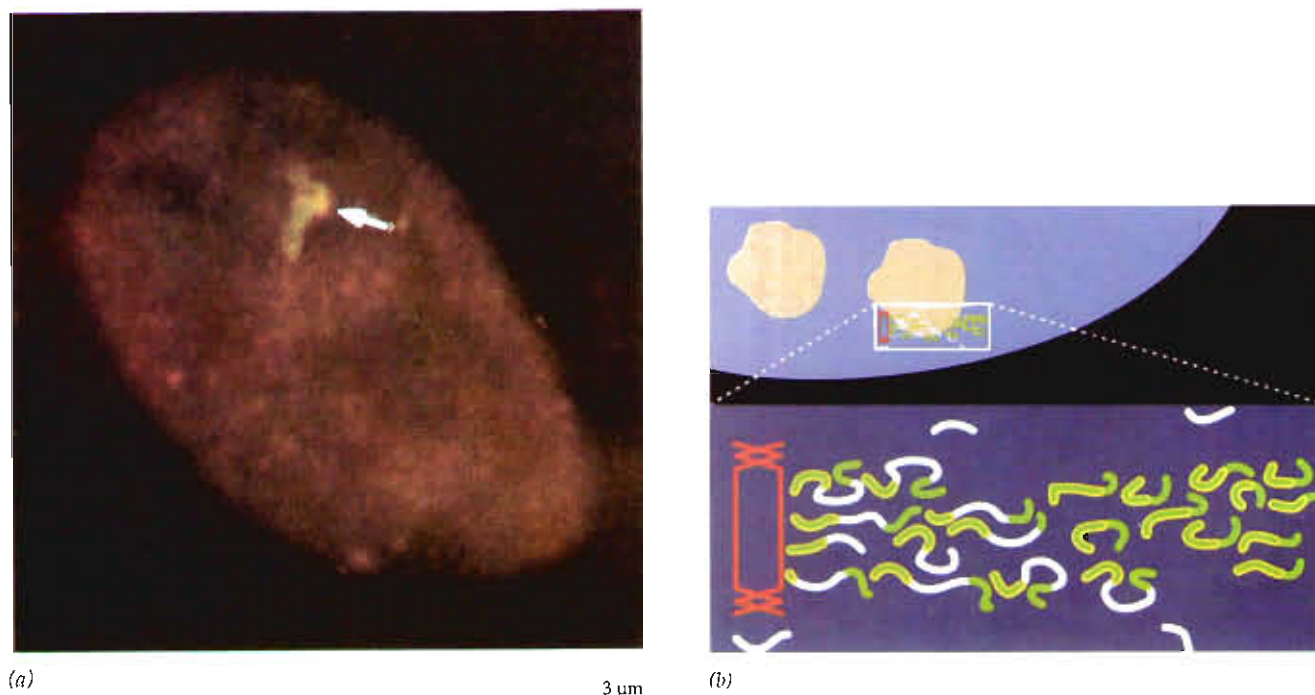


FIGURA 12-25. Localización experimental de RNA recién sintetizado en el núcleo. *a)* Localización simultánea del gen de fibronectina y de su transcrito primario mediante doble marcado FISH (fluorescencia de hibridación *in situ*). En este experimento, una sonda DNA se conjuga con biotina y otra con digoxigenina. Se permite que las sondas se enlacen a secuencias complementarias en el núcleo, y su localización se determina incubando la preparación con moléculas fluorescentes de colores distintos que se enlazan específicamente a la biotina o a la digoxigenina. La sonda empleada para localizar el gen de fibronectina contiene una secuencia que sólo se enlaza a la región no transcrita que flanquea el extremo 5' del gen, y por lo tanto no se enlaza al transcrito de RNA. El sitio del gen de fibronectina está indicado por una coloración fluorescente de color amarillo rojizo (flecha). La localización de los transcritos de fibronectina está indicada por la coloración fluorescente verdosa que se observa como rastro difuso indicando que el RNA permanece concentrado en la vecindad del gen después de su síntesis. *b)* Modelo esquemático para la vía de procesamiento dentro de un transcrito primario. Se muestra una versión simplificada del transcrito primario, con un solo intrón indicado en blanco y exones indicados en verde. El gen transcrito se muestra en rojo. (Reimpreso con permiso de Yigong Xing, Carol V. Johnson, Paul R. Dobner y Jeanne B. Lawrence, *Science* 259:1328, 1993; copyright 1993 American Association for the Advancement of Science.)

ne. En presencia de triptófano, los genes que codifican estas enzimas son **reprimidos**.

El operón bacteriano

En las bacterias, los genes que contienen la información para ensamblar las enzimas de una vía metabólica de ordinario se agrupan en el cromosoma en un complejo funcional denominado **operón**. Todos los genes del operón son coordinados mediante un mecanismo de control descrito por primera vez en 1961 por Francois Jacob y Jacques Monod, del Instituto Pasteur de París. Un operón bacteriano típico consta de genes estructurales, una región promotora, una región operadora y un gen regulador (fig. 12-27).

Los **genes estructurales** codifican enzimas por sí mismos. Los genes estructurales de un operón de ordinario se sitúan adyacentes entre sí, y una polimerasa de RNA se desplaza de un gen estructural al siguiente, transcribiendo todos los genes a un solo RNAm. Este RNAm gigante se traduce después en polipéptidos distintos que se convierten en las diferentes enzimas de la vía meta-

bólica. Por consiguiente, al ponerse en marcha un gen activa a todos los productores de enzimas de un operón.

- El **promotor** es el sitio activo donde la polimerasa de RNA se une al DNA antes de iniciar la transcripción (analizado en la página 438). El **operador** se sitúa entre el promotor y el primer gen estructural donde sirve como sitio de enlace para una proteína, denominada **represora**. La represora es un ejemplo de **proteína reguladora de un gen** capaz de reconocer una secuencia específica de pares de bases dentro del DNA y enlazarse a dicha secuencia con afinidad elevada. Como se notará en las siguientes secciones de este capítulo, las proteínas enlazadas al DNA, como los represores bacterianos, desempeñan un papel predominante para determinar si un segmento particular del genoma es transcripcionalmente activo o silencioso.
- El **gene regulador** codifica a la proteína represora.

La clave para la expresión del operón estriba en el represor. Cuando el represor se enlaza al operador (fig. 12-27), el promotor queda protegido de la polimerasa, y la transcripción de los genes estructurales se interrumpe. Si el represor puede enlazarse o no al operador depende de la

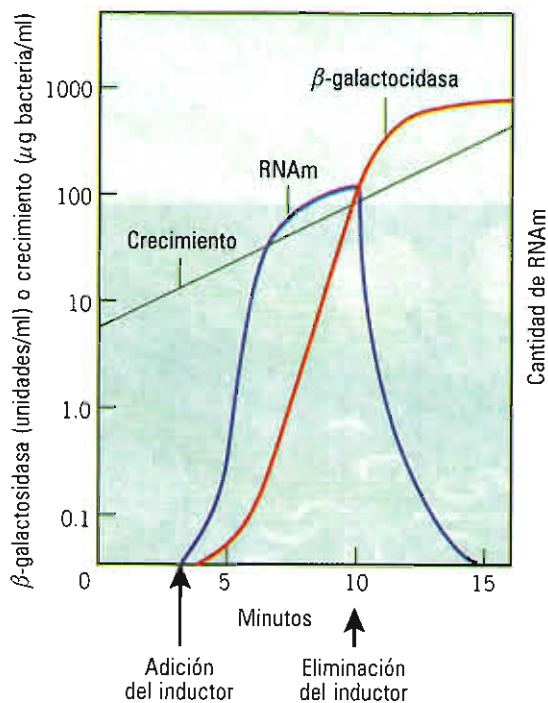


FIGURA 12-26. Cinética de la inducción de β -galactosidasa en *E. coli*. Cuando se añade un inductor apropiado (β -galactósido), la producción de RNAm para la enzima β -galactosidasa se inicia con más rapidez y después de un minuto aproximadamente aparece la enzima, cuya concentración se incrementa de manera acelerada. La eliminación del inductor conduce a descenso precipitado de la concentración del RNAm, que refleja su desdoblamiento rápido. La cantidad de enzima desciende porque no se sintetizan nuevas moléculas.

forma de dicho represor, la cual, a su vez, depende de la presencia o ausencia de un compuesto clave en la vía metabólica, como lactosa o triptófano. La concentración de esta

sustancia metabólica clave determina si el operón es activo o inactivo en cualquier momento dado.

El operón lac

La interacción entre estos diferentes elementos se ilustra con el *operón lac*, el grupo de genes que regula la producción de las enzimas necesarias para metabolizar lactosa en las células bacterianas. El operón *lac* es un ejemplo de **operón inducible**; o sea, aquel en el cual la presencia de una sustancia metabólica clave (en este caso lactosa) induce la transcripción de genes estructurales (fig. 12-28, a). El operón *lac* contiene tres genes estructurales en serie. Cuando se dispone de lactosa, el disacárido entra a la célula donde se une al represor, cambiando la conformación del represor e incapacitándolo para fijarlo al DNA del operador. En este estado, los genes estructurales se transcriben, se sintetizan las enzimas y las moléculas de lactosa se consumen. Así, en un operón inducible, como el operón *lac*, la proteína represora es capaz de enlazarse al DNA sólo en ausencia del inductor. Conforme disminuye la concentración de lactosa en el medio, el disacárido se separa de su sitio de enlace sobre la molécula represora. La liberación de lactosa permite al represor enlazarse al operador, lo que físicamente bloquea la polimerasa y le impide alcanzar a los genes estructurales, interrumpiendo la transcripción efectuada por el operón.

Control positivo mediante AMP cíclico

El represor *lac* ejerce su influencia mediante *control negativo*, puesto que la interacción del DNA con esta proteína inhibe la expresión del gen. El operón *lac* también se encuentra bajo *control positivo*, según se descubrió durante una de las primeras investigaciones del fenómeno denominado *efecto glucosa*. Cuando se suministra glucosa a las células bacterianas, y también algunos otros tipos de sustratos, como lacto-

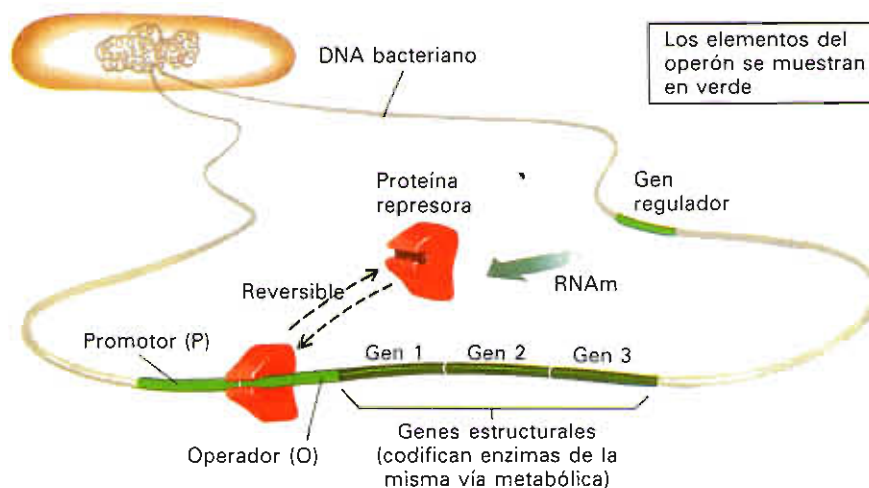


FIGURA 12-27. Organización de un operón bacteriano. Las enzimas que constituyen una vía metabólica están codificadas en una serie de genes estructurales que residen en disposición contigua en el cromosoma bacteriano. Todos los genes estructurales de un operón se transcriben a un RNAm continuo, el cual se traduce a polipéptidos separados. La transcripción de los genes estructurales está controlada por una proteína represora que, cuando se une al sitio operador del DNA, impide el movimiento de la RNA polimerasa a partir del promotor de los genes estructurales.

sa o galactosa, las células metabolizan la glucosa e ignoran los otros compuestos. La glucosa en el medio actúa para suprimir la producción de diferentes enzimas catabólicas, como la β -galactosidasa, necesarias para descomponer estos otros sustratos. En 1965 hubo un sorprendente descubrimiento. El AMP cíclico, el cual previamente se pensó que sólo participaba en el metabolismo de los eucariotes, se descubrió en células de *E. coli*. Se observó que la concentración de AMPc en las células se relaciona con la presencia de glucosa en el medio: cuanto mayor la concentración de glucosa, menor la concentración de AMPc. Además, cuando se añade AMPc al medio en presencia de glucosa, todas las enzimas catabólicas normalmente ausentes de pronto fueron sintetizadas por las células.

El mecanismo exacto mediante el cual la glucosa disminuye la concentración de AMPc todavía no se ha dilucidado, pero el mecanismo mediante el cual el AMPc supera el efecto de la glucosa es bien comprendido. Como se podría esperar, una molécula pequeña, como la del AMPc (fig. 15-2) no puede estimular directamente la expresión de una serie específica de genes. Igual que en las células eucariotas, el AMPc actúa enlazándose a una proteína, en este caso la *proteína activadora de catabolitos (PAC) del gen*. La PAC es incapaz de enlazarse por sí misma al DNA; sin embargo, cuando forma un complejo con el AMPc, el complejo CAP-AMPc reconoce y se enlaza a un sitio específico en la región control *lac* (fig. 12-29). La presencia de la PAC enlazada provoca un cambio en la conformación del DNA, que permite a la RNA polimerasa transcribir el operón *lac*. Si la transcripción ocurre o no, en realidad depende de la presencia o ausencia del represor enlazado, lo que señala si el sustrato lactosa está o no disponible.

El operón *trp*

En un **operón represible**, como el operón triptófano (*trp*), el represor no puede enlazarse por sí mismo al operador DNA. En vez de esto, el represor sólo es activo como proteína que se enlaza al DNA cuando forma un complejo con un *corepresor*, como el triptófano (fig. 12-28, b). En ausencia de triptófano, el sitio operador se encuentra abierto para enlazarse a la RNA polimerasa, que transcribe los genes estructurales del operón *trp*, lo que conduce a la producción de enzimas que sintetizan triptófano. Cuando el triptófano está disponible, las enzimas de la *vía sintética de triptófano* ya no son necesarias y el complejo represor-triptófano impide la transcripción.

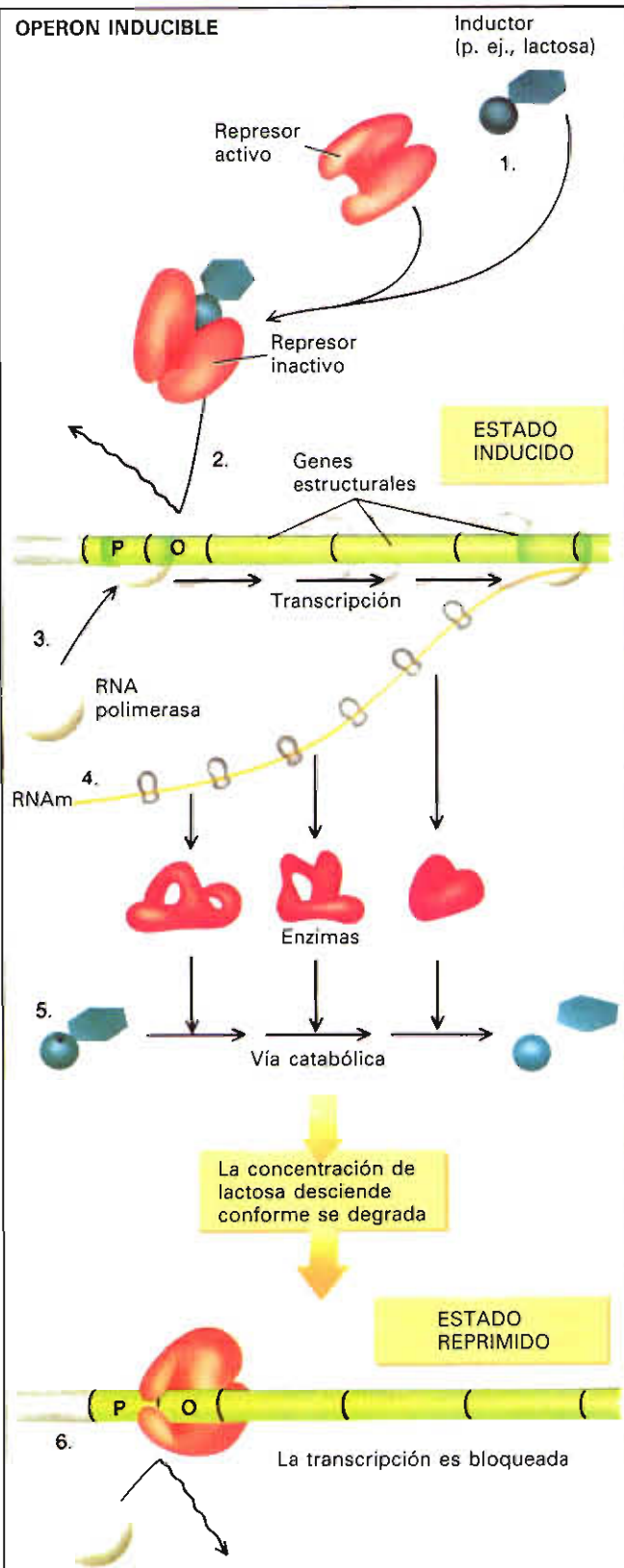
12-3 Control de la expresión de genes en eucariotes

Las proteínas sintetizadas por una célula bacteriana son determinadas extensamente por las condiciones en las cuales está creciendo la célula. Los problemas que confrontan las células eucariotas son más complejos. Además de poseer un genoma que contiene mucha mayor información, las células de una planta o animal complejo existen en gran variedad de estados diferenciados. Los vertebrados se componen de cientos de tipos diferentes de células, cada una mucho más compleja que una célula bacteriana, y requieren una serie distinta de proteínas que les permita ejecutar sus diferentes actividades especializadas.

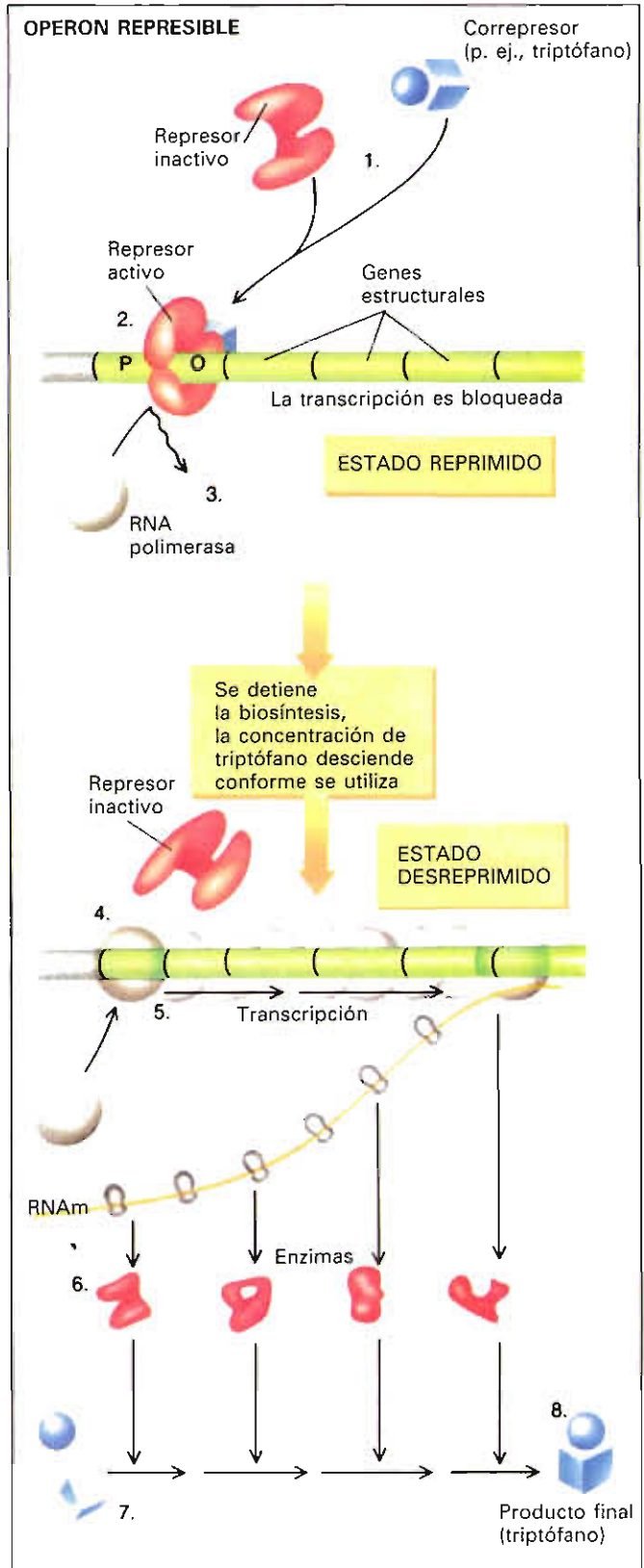
Hubo un tiempo en que los biólogos pensaron que las células alcanzaban un estado particular de diferenciación reteniendo aquellas partes de los cromosomas requeridas para las funciones de las células de ese tipo, en tanto que se eliminan las partes innecesarias de los cromosomas. Esta idea de que la diferenciación se acompaña de la pérdida de información genética fue abandonada en los decenios de 1950 y 1960 gracias a una serie de experimentos clave efectuados tanto en plantas como en animales, demostrando que las células diferenciadas retienen los genes requeridos para la formación de otros tipos de tejidos diferentes de aquellos de donde se tomaron dichas células. Por ejemplo, Frederick Steward y sus colegas, de la Universidad Cornell, demostraron que se podían aislar células individuales de las raíces de una planta madura y, bajo condiciones apropiadas de laboratorio, indujeron su crecimiento en una planta totalmente desarrollada que contenía todos los diferentes tipos de células normalmente presentes.

Las células simples de un *animal* adulto no pueden originar individuos nuevos, pero el núcleo de dichas células muestra capacidad para apoyar el desarrollo de un nuevo individuo. Esto fue demostrado por primera vez en anfibios por John Gurdon, de la Universidad Oxford. Gurdon quitó el núcleo de una célula adulta de la piel del sapo con garras *Xenopus laevis*, y trasplantó dicho núcleo a un huevo activado cuyos propios cromosomas fueron destruidos mediante irradiación (fig. 12-30). El huevo que recibió el núcleo trasplantado se desarrolló en un renacuajo bien formado que contenía varias células totalmente diferenciadas, además de las células de la piel. De estos experimentos es evidente que los núcleos de células especializadas, como las de raíces de plantas o piel de animales, contienen la información genética necesaria para la diferenciación de muchos tipos diferentes de células. Los resultados de una gran variedad de experimentos indican que las células no pierden material genético cuando sufren diferenciación. Más bien, las células que se convierten en celdillas hepáticas, por ejemplo, sufren esta transformación porque expresan un conjunto específico de "genes hepáticos", en tanto que las células que se desarrollan para formar neuronas lo hacen por que expresan un conjunto de "genes de nervios".

La célula bacteriana promedio contiene suficiente DNA para codificar unos 3 000 polipéptidos, de los cuales casi la tercera parte se expresan típicamente en cualquier momento particular. Esto se puede comparar con las células humanas que contienen DNA suficiente (6 000 millones de pares de bases) para codificar varios millones de polipéptidos distintos. Aunque la mayor parte de este DNA no contiene en realidad información para codificar proteínas, se estima que los mamíferos sintetizan hasta 100 000 diferentes polipéptidos durante toda su vida. De esta cifra, se estima que una célula típica de mamífero elabora casi 5 000 diversos polipéptidos en cualquier momento determinado. Muchos de estos polipéptidos, como las enzimas de la glucólisis o los transportadores de electrones de la cadena respiratoria, prácticamente se sintetizan en todas las células del cuerpo. Al mismo tiempo, cada tipo de célula contiene proteínas que son únicas para su estado de diferenciación. Estas proteínas, más que cualquier otro componente celular, confieren a la célula sus características únicas. A causa de esta



(a)



(b)

FIGURA 12-28. Regulación del gen por operones. Operones inductores y represores operan bajo un principio similar: si el represor puede enlazarse al represor, los genes se inactivan; si el represor es inactivado y no puede enlazarse al operador, los genes se expresan.

a) Operones inductores. 1) En concentración elevada, el inductor (en este caso, disacárido lactosa) se enlaza a la proteína represora y 2) impide que se fije al operador (O). 3) Sin el represor en su camino, la RNA polimerasa se fija al promotor (P), y 4) transcribe los genes estructurales. Por lo tanto, cuando la concentración de lactosa es alta, se induce el operón, y se elaboran las enzimas necesarias para digerir azúcar. 5) Conforme se metaboliza en azúcar su concentración disminuye, 6) provocando que el inductor enlazado a moléculas se disocie del represor, el cual entonces recupera su capacidad para fijarse al operador y evitar la transcripción. Así, cuando la concentración de inductor es baja, el operón está reprimido, evitando la síntesis de enzimas innecesarias.

b) En un operón represible, como el operón *trp*, el represor, por sí mismo, es incapaz de enlazarse al operador, y los genes estructurales que codifican las enzimas son transcritos activamente. Las enzimas del operón *trp* catalizan las reacciones para sintetizar esta enzima esencial. 1) Cuando se encuentran disponibles, las moléculas de triptófano actúan como correpresores uniéndose al represor inactivo, y 2) cambian su forma de modo que pueda fijarse al operador, 3) evitando la transcripción de los genes estructurales. Por lo tanto, cuando la concentración de triptófano es alta, el operón está reprimido, evitando la producción excesiva de triptófano. 4) Cuando la concentración de triptófano es baja, la mayor parte de las moléculas represoras carecen de un correpresor y por lo tanto no se fijan al operador. 5) Se transcriben los genes, 6) se sintetizan enzimas, y 7) se elabora el producto final necesario (triptófano). 8) Conforme la biosíntesis prosigue, el triptófano se acumula en una concentración lo bastante alta para reprimir de nuevo al operón (paso 1).

tremenda cantidad de DNA que se encuentra en las células eucariotas y el gran número de diferentes proteínas que se ensamblan, la regulación de la expresión de genes en una célula eucariota es un proceso extraordinariamente complejo, el cual apenas comienza a comprenderse.

Consideremos la situación que enfrenta una célula que se desarrolla para formar un eritrocito dentro de la médula ósea humana. La hemoglobina equivale a más de 95% de su proteína, pero los genes que codifican los polipéptidos de hemoglobina representan menos de una millonésima de su DNA total. La célula no sólo tiene que encontrar esta "aguja" genética en el "pajar" cromosómico, sino también debe regular su expresión con tal grado de precisión que la pro-

ducción de estos pocos polipéptidos se convierta en la actividad sintética dominante de las células. Puesto que la cadena de acontecimientos que conducen a la síntesis de una proteína particular consta de varias etapas separadas, hay varios niveles en los cuales se puede ejercer control. La regulación de la expresión de un gen en células eucariotas ocurre principalmente a tres niveles distintos (fig. 12-31).

1. Los mecanismos de control a nivel de transcripción determinan si un gen particular será transcrito y en caso afirmativo, con qué frecuencia.
2. Los mecanismos de control a nivel de procesamiento determinan la vía para procesar un transcrito de RNA primario en un RNA mensajero que puede traducirse en un polipéptido.
3. Los mecanismos de control a nivel de traducción determinan si un RNAm particular será realmente traducido, y si esto es así, con qué frecuencia y durante cuánto tiempo.

Antes de considerar estos tres niveles principales de control de la expresión del gen, estudiaremos otras dos estrategias empleadas por unos cuantos tipos de células, pero que son interesantes como ejemplos de la manera en que las células reconocen un grupo específico de sitios genéticos expresados selectivamente.

Amplificación selectiva de las plantillas de DNA

La **amplificación selectiva de genes** es un proceso en el cual una porción limitada del genoma sufre específicamente una duplicación excesiva como medio de aumentar el número de copias de un conjunto particular de genes. La amplificación selectiva de genes podría suministrar potencialmente un mecanismo para incrementar la expresión de aquellos genes que desempeñan un papel clave en las actividades de determinado tipo de célula, como los genes de globina en una célula destinada a convertirse en eritrocito. Sin embargo, los resultados de una gran variedad de experimentos indican que la amplificación selectiva de genes no

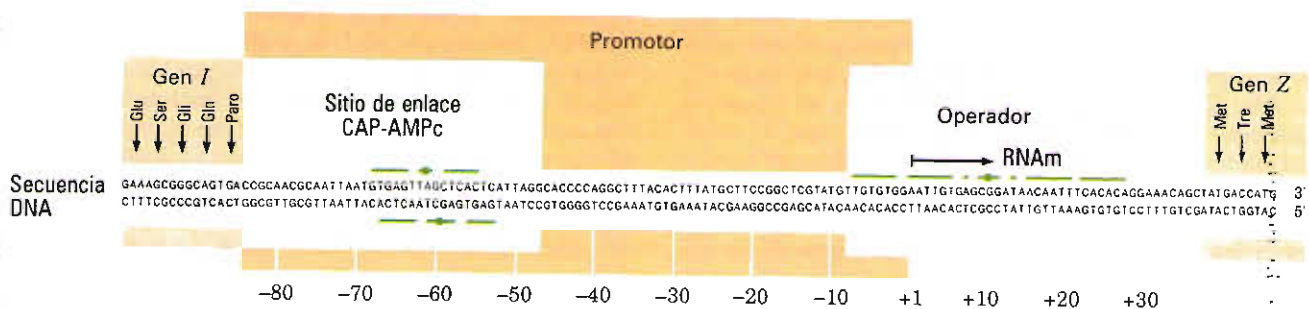


FIGURA 12-29. Secuencia de nucleótidos de los sitios de enlace en la región controlada por el operón *lac*. La región promotora contiene el sitio de enlace para la proteína CAP y también para la RNA polimerasa. El sitio para iniciar la transcripción está indicado +1, que se encuentra aproximadamente 30 nucleótidos adelante del sitio en el cual se inicia la traducción. (Reimpreso con permiso de R.C. Dickson y cols. *Science* 187:32, 1975; copyright, 1975 American Association for the Advancement of Science.)

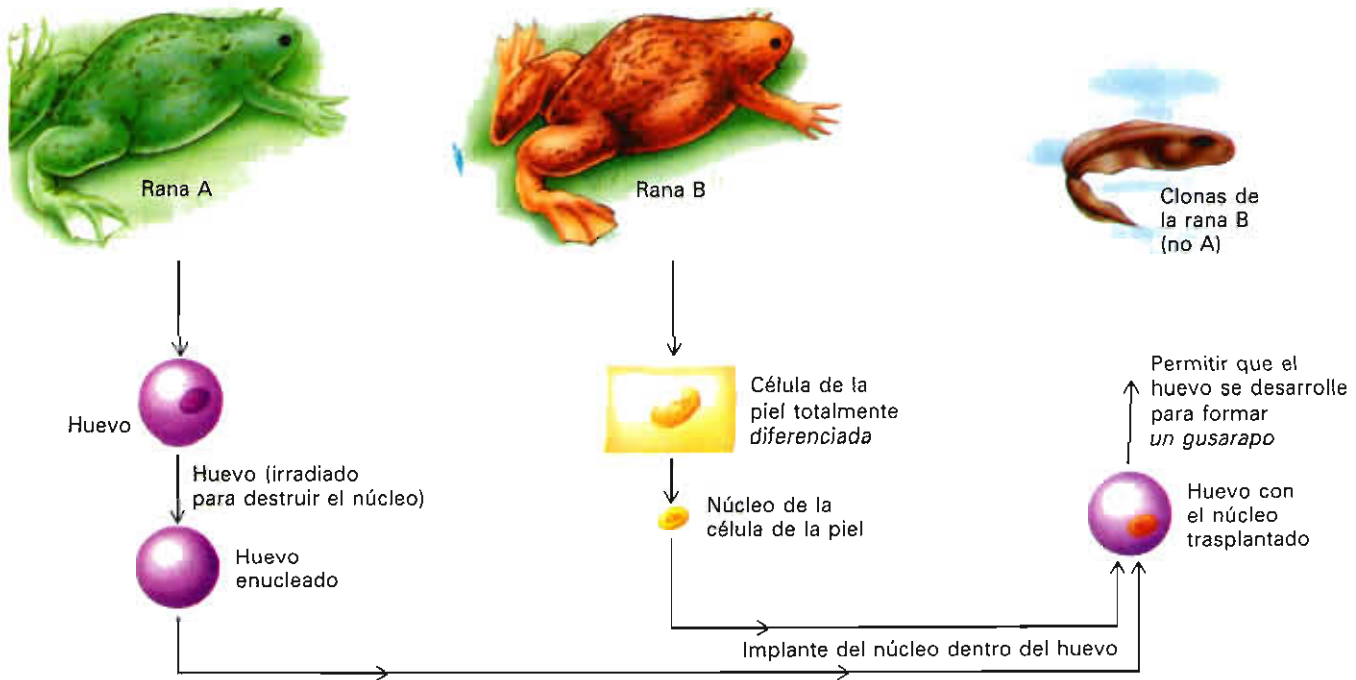


FIGURA 12-30. Resultados de un experimento empleando trasplante de núcleos. Cuando se trasplanta el núcleo de una célula diferenciada de la piel de *Xenopus* dentro de un óvulo activado enucleado, el óvulo se desarrolla como un gusarapo de aspecto normal con una amplia variedad de células diferenciadas distintas de las células de la piel. Puesto que todos los genes del gusarapo se derivan del núcleo trasplantado (lo que se puede demostrar mediante el uso de marcadores genéticos), estos experimentos confirman la creencia ampliamente difundida de que las células diferenciadas retienen toda la información genética originalmente presente en el cigoto.

es un mecanismo general para lograr la tasa máxima de expresión genética. Aunque determinada célula diferenciada pueda producir grandes cantidades de una especie particular de proteína, no es necesaria la presencia de un mayor número de plantillas de DNA, y basta que la secuencia de DNA ocurra en una sola copia por conjunto de cromosomas haploides.

La amplificación selectiva de genes no es un proceso que sucede extensamente, pero se conocen varios ejemplos bien comprobados. Por ejemplo, los genes que codifican RNA ribosómico en los grandes oocitos de anfibios son selectivamente amplificados. A diferencia de un RNAm único, que se puede traducir miles de veces para producir millares de copias de un polipéptido particular, una molécula única de RNAr sólo puede formar parte de un ribosoma particular. Conforme el oocito del anfibio crece, su volumen aumenta de manera espectacular y se llena de ribosomas que el embrión en desarrollo utilizará para satisfacer sus necesidades de proteínas nuevas. Aun cuando los genomas de los anfibios contengan cientos de copias de los genes que codifican RNA ribosómico (pág. 408), todavía se requieren copias adicionales para suministrar las plantillas necesarias. Estas plantillas se generan mediante un proceso de duplicación que libera DNA circular que contiene copias en serie de los genes de RNAr. Cada una de las moléculas de DNAr sirve como sitio organizador para la formación de

sus propios nucléolos, que se convierten en sitios de ensamblado de ribosomas en el gran núcleo del oocito (fig. 11-13). Es irrelevante si el RNAr 5S del oocito del anfibio, requerido en igual número por los otros RNAr, se sintetiza a partir de plantillas de DNA que no son amplificadas. Más bien, el genoma de estos anfibios contiene unos 20 000 genes 5S presentes en toda las células del animal, pero que sólo se usan en la formación del oocito.

Aunque un solo RNAm puede dirigir el ensamblado de numerosas cadenas de polipéptidos, se conocen unos pocos casos en los cuales la elevada demanda de proteínas requiere un incremento selectivo del número de plantillas de DNA. Por ejemplo, en *Drosophila* el huevo está recubierto por una cáscara (corion) producida por las células que lo rodean durante un breve periodo al final de la ovogénesis. Las 20 o más proteínas que constituyen el corion son codificadas por dos grupos de genes localizados sobre cromosomas separados. Conforme se aproxima el tiempo para la formación de la cáscara del huevo, un grupo de genes se amplifica selectivamente casi 15 veces, en tanto que el otro grupo se amplifica más de 60 veces. La amplificación ocurre por el inicio repetido de la síntesis de DNA a partir de sitios definidos dentro de cada grupo de genes del corion. Las secuencias de DNA incrementadas suministran el número necesario de plantillas para sintetizar la cantidad requerida de moléculas de proteína.

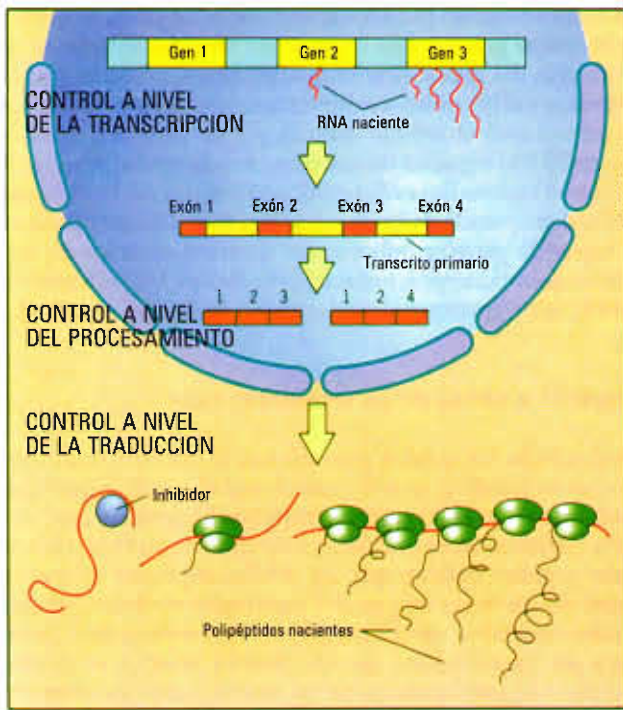


FIGURA 12-31. La expresión del gen es controlada en tres niveles primarios. Los controles a nivel de la transcripción operan para regular cuáles genes se transcriben y con qué frecuencia; los controles a nivel de procesamiento operan para determinar qué partes de los transcritos primarios formarán parte de la reserva de RNAm celular; y los controles a nivel de traducción regulan si un RNAm particular será traducido o no y, en caso afirmativo, con qué frecuencia y durante cuánto tiempo.

Reordenamiento de las secuencias de DNA que participan en la formación de anticuerpos

En la página 63 se estudió la estructura de las moléculas de anticuerpo. Cada molécula de anticuerpo se compone de dos tipos de cadenas de polipéptidos: cadenas ligeras (L) y cadenas pesadas (H). Ambos tipos contienen dos partes identificables: una posición variable (V), cuya secuencia de aminoácidos varía de un anticuerpo a otro, y una porción constante (C), cuya secuencia de aminoácidos es idéntica entre todas las cadenas H o L del mismo tipo. ¿Cuál es la base genética para la síntesis de polipéptidos en los cuales se mezcla una secuencia de aminoácidos compartida y única?

En 1965, William Dreyer, del California Institute of Technology, y J. Claude Bennett, de la Universidad de Alabama, propusieron la hipótesis de "dos genes-un polipéptido" para explicar la estructura de los anticuerpos. En esencia, Dreyer y Bennett propusieron que cada cadena de anticuerpo es codificada por dos genes separados: un gen C y un gen V, que de alguna manera se combinan para formar un "gen" continuo que codifica una sola cadena ligera o pesada. Once años después, en 1976, Susumu Tonegawa, trabajando en un instituto de investigación en Suiza, sumi-

nistró datos claros en favor de la hipótesis del reordenamiento del DNA. Tonegawa y sus colegas midieron en el DNA la distancia entre las secuencias de nucleótidos que codifican las porciones C y V de una cadena particular de anticuerpos. Compararon esta distancia en el DNA aislado de dos tipos diferentes de células de ratón, células de embriones y células del plasma secretorias de anticuerpos. Aunque estos dos segmentos de DNA se encontraban ampliamente separados en el DNA obtenido de embriones, dichos segmentos se encontraban muy próximos en el DNA obtenido de las células plasmáticas. Estos datos sugieren fuertemente que las partes del DNA en realidad se reordenan durante la formación de células productoras de anticuerpos.

Una investigación posterior reveló que el DNA de un cromosoma particular contiene un solo gen C y un gran número de genes diferentes V. Durante el proceso de reordenamiento, que ocurre en tanto el linfocito está maduro en la médula ósea, el gen C se desplaza a un punto muy próximo de uno de los genes V, lo que permite la transcripción de un solo RNAm a partir de estos elementos genéticos combinados. Consideremos con mayor detalle este proceso.

En el paso 1 de la figura 12-32 se muestra la organización de las secuencias de DNA que participan en la formación de las cadenas ligeras κ del ratón. En este caso, varios genes V se localizan en disposición lineal separada del gen C único por cierta distancia. El análisis de la secuencia de nucleótidos de estos genes V indicó que eran un poco más cortos que lo necesario para codificar la porción correspondiente de la región V de la cadena ligera κ . La razón de esto se aclaró cuando se secuenciaron otros segmentos de la región. El tramo de nucleótidos que codifica a los 13 aminoácidos en el extremo carboxilo de la región V se encuentra a cierta distancia del resto de las secuencias del gen. Esta pequeña porción que codifica el extremo de la región V se denomina *segmento J*. Como se muestra en la figura 12-32, hay cinco segmentos J distintos (con secuencia similar de nucleótidos) dispuestos en serie. El grupo de segmentos J se separa entonces del gen C mediante un tramo adicional de más de 2 000 nucleótidos. El verdadero reordenamiento ocurre cuando un gen específico V se junta a uno de los segmentos J, formando por lo tanto una secuencia completa y específica del gen B que aún se encuentra separada del gen C por 2 000 a 4 000 nucleótidos (pasos 2 y 3, fig. 12-32). Antes de la transcripción no se requiere movimiento adicional de DNA; toda la región genética se transcribe en un transcrito primario grande (paso 4) a partir del cual el RNA de empalme secciona porciones no codificantes (paso 5).

En este caso, el de las cadenas ligeras κ del ratón, se estima que el DNA de las células germinales contiene unos 300 genes V. Por lo tanto, si asumimos que las uniones V-J ocurren al azar, podría esperarse que un ratón sintetizara casi 1 500 diferentes tipos de cadenas κ (cinco segmentos J por 300 genes V). Un análisis posterior reveló que el sitio donde el segmento J se une a la región V puede variar algo de un reordenamiento a otro. Esta variabilidad en el sitio de unión V-J aumenta la diversidad de las cadenas κ unas 10 veces más, alcanzando así un número máximo de casi 15 000 especies de cadenas κ . Puesto que el sitio donde ocurre la unión V-J es parte de una de las regiones hipervariables del polipéptido del anticuerpo (fig. 2-44), las ligeras diferencias

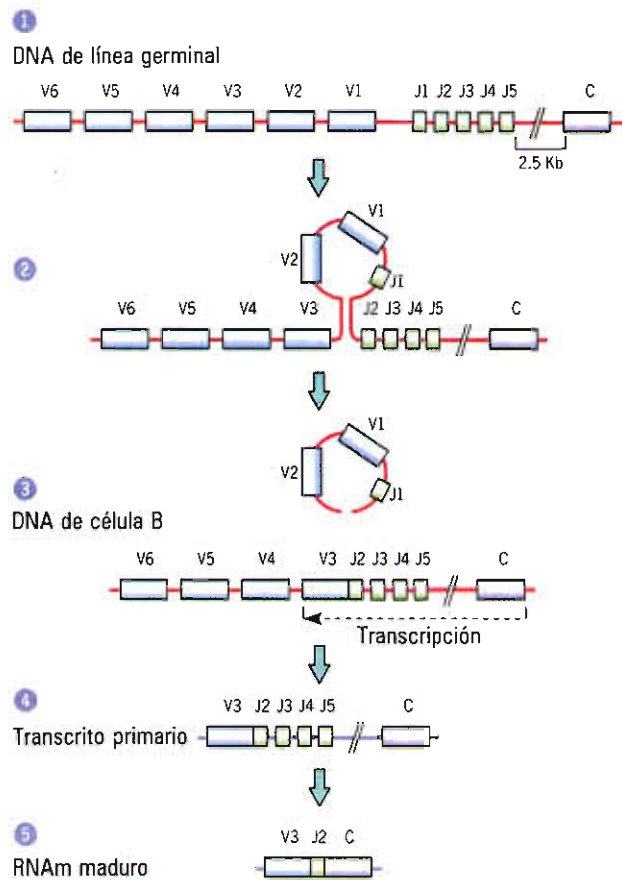


FIGURA 12-32. Reordenamiento del DNA que conduce a la formación de un gen funcional que codifica la cadena κ de una inmunoglobulina. En el paso 1 se muestra la organización de las secuencias de DNA variable (V), de unión (J) y constante (C) dentro del genoma. Los pasos que conducen a la síntesis del RNAm maduro que codifica el polipéptido de la cadena κ se describen en el texto. La unión al azar de un segmento V y uno J (pasos 2 y 3) determina la secuencia de aminoácidos del polipéptido. El espacio entre el segmento J "elegido" y el segmento C (que puede contener uno o más segmentos J, como se muestra en la figura) permanece como un intrón en el gen (paso 4). La porción del transcrito primario que corresponde al intrón se elimina durante el procesamiento del RNA (paso 5).

en el sitio de unión pueden tener efectos importantes sobre la interacción antígeno-anticuerpo.

El reordenamiento de las secuencias de DNA ya descrito tiene consecuencias muy importantes para un linfocito. Una vez que se une con éxito una secuencia específica V_{κ} a la secuencia J_{κ} , la célula no puede sintetizar ninguna otra especie de cadena κ . Este análisis se restringe a las cadenas ligeras κ por razones de sencillez. Ocurren reordenamientos similares del DNA durante el compromiso de la célula para sintetizar una cadena ligera λ de tipo particular y una cadena pesada específica.

Más que cualquier otro proceso, la formación de genes de anticuerpos por reordenamiento del DNA ilustra el potencial del genoma para participar en actividades dinámicas. La existencia de este mecanismo de "barajamiento" de ge-

nes ilustra cómo un puñado de secuencias de DNA presentes en la estirpe germinal da lugar a una notable diversidad de productos del gen. Como se analizó antes, un ratón puede sintetizar varios miles de diferentes especies de cadenas κ . Se estima que el mismo animal puede producir cuando menos 50 000 especies de cadenas pesadas más grandes. Si cualquier cadena ligera determinada puede combinarse con otra cadena pesada definida, un solo ratón (o un ser humano) es capaz de generar millones de diversas especies de moléculas de anticuerpos, todas a partir de casi 1 000 elementos genéticos originalmente presentes en la estirpe germinal.

Control a nivel de la transcripción

Igual que en las células procariotas, la transcripción diferencial de genes es el mecanismo aislado más importante mediante el cual las células eucariotas determinan qué proteína sintetizarán en cualquier momento de su vida. Numerosas pruebas indican que las células expresan diferentes genes en distintas etapas del desarrollo embrionario por células en tejidos variados o por células expuestas a diversos tipos de estímulos. En los últimos 10 años se avanzó mucho en el conocimiento de los mecanismos que permiten que ciertos genes sean transcritos en una célula particular, en tanto que todos los demás genes del genoma permanecen silenciosos. Se han purificado numerosas proteínas, llamadas **factores de transcripción**, cuyo papel es enlazarse a secuencias específicas de DNA y estimular o inhibir la transcripción de genes parecidos.¹

Aunque se conoce la estructura de varios factores de transcripción y su manera de interactuar con su secuencia de DNA específica, una descripción unificada de su mecanismo de operación aún es un objetivo distante. Por ejemplo, es evidente que un solo gen puede estar controlado por diferentes sitios reguladores capaces de enlazarse a diversas proteínas reguladoras. Por lo contrario, una sola proteína enlazada a DNA puede fijarse a numerosos sitios alrededor del genoma y controlar la expresión de multitud de genes diferentes. Es evidente que el control de la transcripción de genes es muy compleja y está influenciada por diversas situaciones, incluyendo la afinidad del factor de transcripción por una secuencia particular DNA y la capacidad de los factores de transcripción para enlazarse a sitios cercanos sobre el DNA que actúan coordinadamente entre sí.

La complejidad inherente al control de la transcripción de genes se puede ilustrar examinando el DNA en el interior de un solo gen y alrededor del mismo; utilizaremos el gen de la metalotioneína como ejemplo (fig. 12-33). La metalotioneína es una pequeña enzima que participa en la detoxificación de metales. En células animales, la síntesis de

¹ Las secuencias reguladoras de DNA a menudo se denominan **elementos de control cis**, puesto que residen en la misma molécula de DNA que el propio gen. Por lo contrario, los factores que participan en la regulación de la transcripción y que no son parte de la molécula de DNA, como los diferentes factores de transcripción que se enlazan a secuencias específicas de DNA, se denominan **elementos de control trans**. Estos términos comúnmente se encuentran en publicaciones relacionadas con la transcripción.

Elementos de respuesta

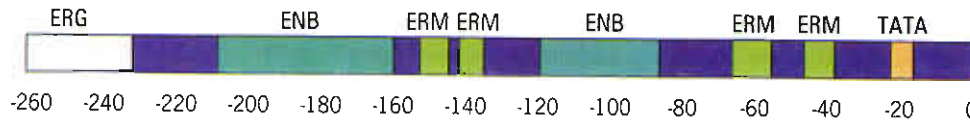


FIGURA 12-33. Región reguladora del gen de metalotioneína. La transcripción de este gen, igual que otros, es controlada por varios factores de transcripción que interactúan específicamente con diferentes secuencias de DNA localizadas en una región reguladora adelante de la región codificadora del gen. Dentro de la región reguladora se incluyen elementos de respuesta a metales (ERM) que enlazan factores de transcripción activados por metales, un elemento de respuesta a glucocorticoides (ERG) que se enlaza a una proteína esteroide receptora, y elementos de nivel basal (ENB) que se enlazan a una proteína necesaria para obtener un nivel basal de transcripción del gen. (Según B. Lewin, *Genes V*, p. 881, Oxford University Press, 1994.)

esta proteína se incrementa mucho luego de la administración de metales, como cadmio o zinc, o en respuesta a un incremento en la concentración de hormonas glucocorticoides secretadas por la corteza suprarrenal. La clave para entender la regulación de la expresión del gen de metalotioneína estriba en descubrir las funciones del gran número de secuencias reguladoras de DNA que residen hacia adelante del propio gen.

El cuadro TATA es la secuencia reguladora más próxima (más proximal) hacia adelante, que es el principal componente del promotor del gen. Recordemos que el promotor es el sitio regulador sobre el DNA que determina el sitio preciso en el cual se inicia la transcripción (pág. 449). Como se estudió en el capítulo 11, el cuadro TATA es el sitio de ensamblado de muchos factores de transcripción *general* requeridos antes que un gen eucariota pueda ser transcrito por una RNA polimerasa II. Para algunos genes, la formación del complejo de preinicio en el sitio del cuadro TATA puede ser suficiente para permitir un nivel basal de transcripción del gen adyacente. Este nivel basal de transcripción se modifica entonces (estimulado o inhibido) por la presencia de otras proteínas de enlace al DNA situadas en otros sitios sobre dicho DNA.

El nivel basal de expresión del gen de metalotioneína al parecer requiere la presencia de un factor de transcripción adicional (llamado AP2) enlazado a los dos *elementos de nivel basal* (ENB) indicados en la figura 12-33. Entre los otros elementos que regulan la expresión del gen de metalotioneína se encuentran los *elementos de respuesta al metal* (ERM), que se enlazan a los factores de transcripción activados por los metales. Los ERM proporcionan el medio para que la célula incremente la transcripción del gen de metalotioneína por arriba del nivel basal en respuesta a la presencia de metales. Nótese que la región reguladora del DNA contiene varios ERM capaces de enlazarse a un factor de transcripción (fig. 12-33). Estudios en los cuales se efectúa la supresión de los ERM del DNA indican que los efectos de las proteínas enlazadas a estos sitios son aditivos; cuanto mayor la concentración del metal, más elevado el número de factores de transcripción enlazados, y mayor la estimulación de la transcripción del gen de metalotioneína. Se asume que los factores de transcripción enlazados a un ERM influyen en la transcripción porque interactúan con el mecanismo de transcripción residente en el cuadro TATA.

Los glucocorticoides estimulan la expresión del gen de metalotioneína por una vía independiente de la empleada por los metales. Estas hormonas esteroideas actúan mediante una serie de *elementos de respuesta a glucocorticoides* (ERG) que comparten una secuencia similar. Cuando las hormonas penetran a una célula blanco, se enlazan a una proteína receptora de glucocorticoide y cambian la conformación de la proteína incrementando su actividad por la secuencia ERG en el DNA (fig. 12-34). Como resultado, el complejo hormona-receptor se convierte en un factor de transcripción "activado" que se enlaza a los diferentes ERG dentro del genoma, incluyendo los situados hacia adelante del gen de metalotioneína. El enlace del complejo receptor-hormona a los ERG del gen de metalotioneína incrementa la tasa de inicio de la transcripción en el promotor cercano. Puesto que la misma secuencia ERG se localiza hacia adelante de diferentes genes sobre distintos cromosomas, un solo estímulo (concentración elevada de glucocorticoides) puede activar de manera simultánea a todos los genes necesarios para una respuesta comprensible.

Además de los tipos de secuencias de DNA descritos antes, la expresión de la mayor parte de los genes también está controlada por un tipo de elemento de DNA llamado **amplificador**, que sirve como sitio de enlace para factores que estimulan la transcripción por arriba del nivel basal. Los amplificadores se distinguen de otros elementos reguladores de DNA por propiedades reveladas a través de la experimentación; en esta forma, los amplificadores se pueden desplazar de un sitio a otro dentro del DNA o incluso invertirse (girar 180°), sin afectar la capacidad de un factor de transcripción enlazado para estimular la transcripción. La supresión de un amplificador puede disminuir el nivel de transcripción por un factor de 100 veces o más. Algunos amplificadores pueden localizarse miles o incluso decenas de miles de bases más adelante del gen cuya transcripción estimulan. El grupo de genes de la globina β humana, por ejemplo, contiene un amplificador que gobierna la transcripción de los diferentes genes de la globina β en un sitio localizado decenas de miles de pares de bases hacia adelante de la mayor parte de ellos. Se piensa que las proteínas enlazadas a los amplificadores estimulan la transcripción al interactuar con componentes específicos (p. ej., TFIIB o TFIID de la figura 11-20) del mecanismo basal de transcripción enlazado al cuadro TATA. Se cree que estos dos sitios distantes sobre el DNA se ponen en estrecho contacto como

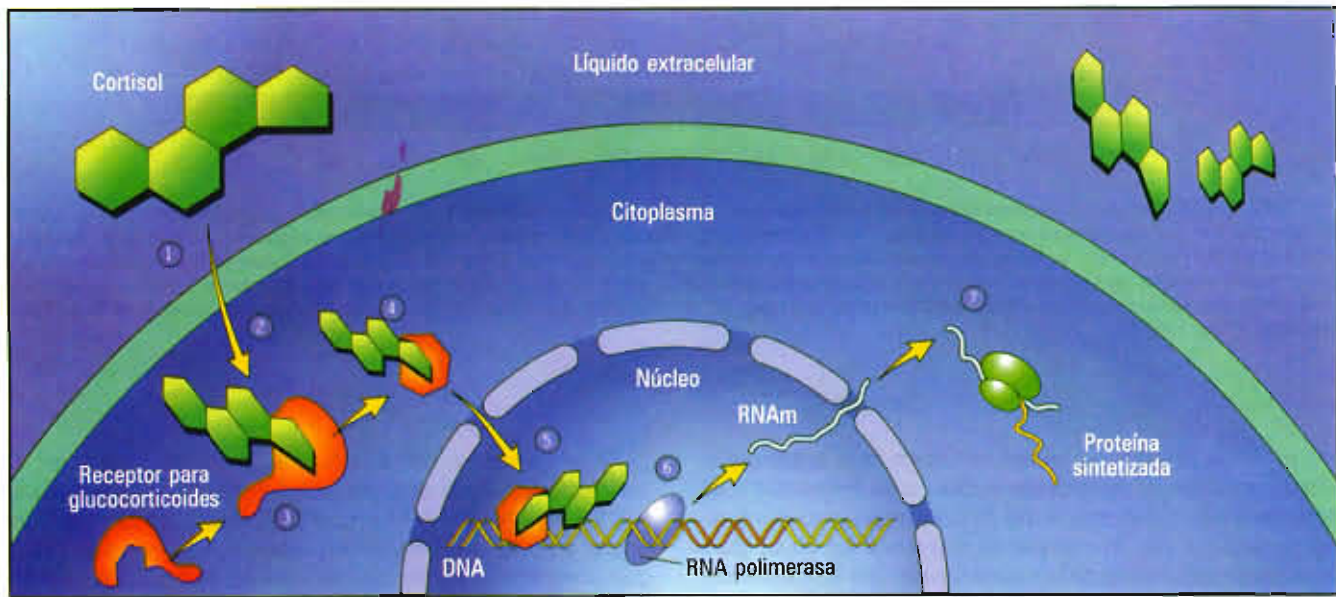


FIGURA 12-34. Pasos en la activación de un gen por una hormona esteroide, como el glucocorticoide cortisol. La hormona penetra a la célula procedente del líquido extracelular (paso 1), difundiéndose a través de la bicapa de lípidos (paso 2) y en el citoplasma, donde se enlaza a un receptor de glucocorticoides (paso 3). El enlace de la hormona cambia la conformación del receptor (paso 4) y provoca la translocación en el núcleo, donde actúa como factor de transcripción que se enlaza al elemento de respuesta a glucocorticoides del DNA (paso 5). El enlace de la hormona activa la transcripción del DNA (paso 6), lo que conduce a la síntesis de proteínas específicas en el citoplasma (paso 7).

resultado de la formación de asas del DNA interpuesto. Ya se ha demostrado muchas veces la capacidad del DNA para mantenerse en forma de asa mediante interacciones entre las proteínas enlazadas; en la figura 12-35 se muestra un ejemplo.

Del número de sitios reguladores ya descritos (y otros de la misma región del DNA que no se mencionaron), es evidente que el control de la expresión del gen a nivel de transcripción puede ser muy complicado. Para comprender cómo interactúan los factores de transcripción con el DNA, entre sí y con las proteínas enlazadas al cuadro TATA, podemos examinar brevemente la estructura de algunas de estas proteínas reguladoras de la transcripción.

Estructura de los factores de transcripción

Mediante cristalografía de rayos X y espectroscopia de resonancia magnética nuclear se ha determinado la estructura tridimensional de algunos complejos DNA-proteína, lo que suministra una imagen básica de la manera en que estas dos moléculas gigantes interactúan entre sí. Igual que la mayor parte de las proteínas, los factores de transcripción contienen diferentes dominios que median distintos aspectos de la función de la proteína. Típicamente, los factores de transcripción contienen cuando menos dos dominios: uno cuya función es reconocer y enlazarse a una secuencia específica de pares de bases en el DNA, y otro que consiste en activar la transcripción interactuando con otras proteínas (fig. 12-36). Podemos comenzar examinando el receptor de glucocorticoides cuyo papel en la estimulación de la expresión del gen de metalotioneína que ya hemos descrito.

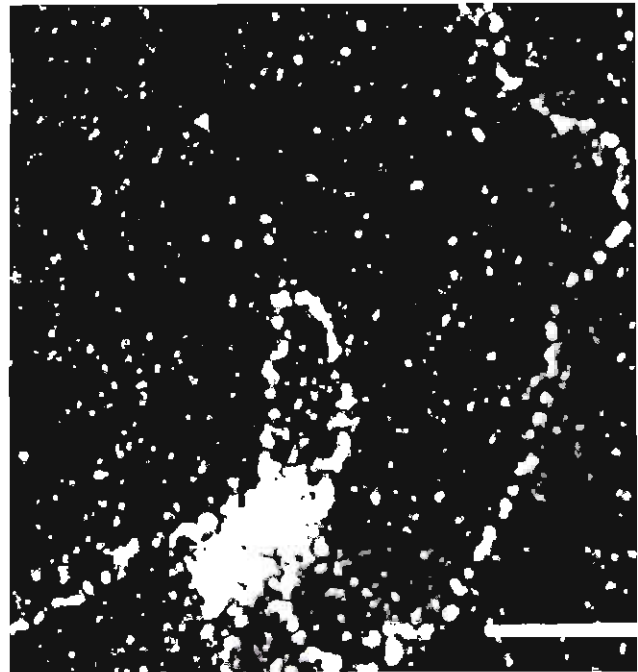


FIGURA 12-35. Mecanismo mediante el cual los factores de transcripción enlazados en sitios distantes pueden influir la expresión del gen. Micrografía electrónica que muestra el enlace del receptor progesterona al DNA por delante del gen de uteroglobina provocando la formación de un asa. La barra es igual a 50 nm. (Reimpreso con permiso de Bernard Theveny y cols., cortesía de Edwin Milgrom, *Nature* 329:79, 1987; copyright 1987 Macmillan Magazines Limited.)

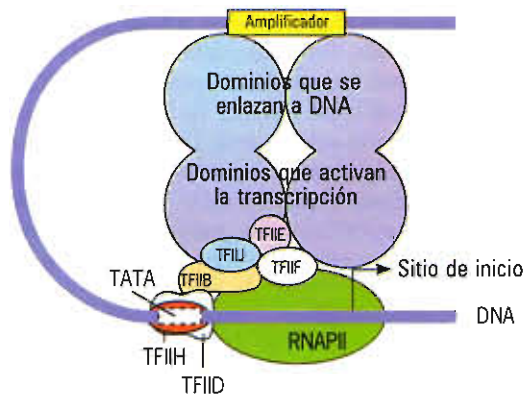


FIGURA 12-36. Los factores de transcripción contienen los dominios de enlace a DNA y de transcripción-activación. Representación esquemática de un factor de transcripción (representado como un dímero igual que la mayor parte de los mostrados hasta ahora) con dominios separados que interactúan con una secuencia DNA específica (un amplificador) y con el mecanismo basal de transcripción que reside en el cuadro TATA del promotor. Se cree que esta última interacción estimula la transcripción (o inhibe la transcripción si el factor es un represor), alterando la conducta del mecanismo de transcripción.

El receptor para glucocorticoides. Los glucocorticoides (como el cortisol) son hormonas esteroides secretadas por la porción más externa de la glándula suprarrenal que promueven la conversión de aminoácidos a glucosa y su captación por el cerebro. La secreción de estas hormonas es más elevada durante periodos de estrés, como durante el ayuno o después de una lesión física grave. Para que una célula responda a los glucocorticoides debe poseer un receptor específico capaz de enlazarse a la hormona. El receptor de glucocorticoides (RG) es miembro de una familia de receptores nucleares (incluyendo receptores para hormona tiroidea, ácido retinoico y estrógenos) que comparten propiedades similares y se cree que han evolucionado a partir de una proteína ancestral común. Igual que los otros miembros de la familia, los RG tienen tres dominios distintos: un dominio para enlazarse a un ligando al cual se une la hormona esteroide, un dominio para enlazarse a DNA que reconoce y se une a una secuencia de DNA específica, y un tercer dominio que activa la transcripción. Las secuencias de DNA capaces de enlazarse a los RG tienen una secuencia similar de nucleótidos que contienen dos tramos simétricos de DNA separados por tres nucleótidos espaciadores. Un ejemplo de secuencia para enlazar RG (p. ej., un elemento de respuesta a glucocorticoides, o ERG) es

5'-AGAACA n nnTGTCT-3'

3'-TCTTGT n nnACAAGA-5'

donde n puede ser cualquier nucleótido. (Se dice que una secuencia de este tipo tiene "simetría rotacional doble" y se denomina *palíndromo*, debido a que las dos cadenas tienen la misma secuencia 5' a 3'.) La importancia del ERG en la mediación de la respuesta hormonal se puede demostrar más claramente introduciendo una de estas secuencias en la región situada más adelante del gen que normalmente no

responde a los glucocorticoides. Cuando células que contienen DNA manipuladas genéticamente se exponen a glucocorticoides, se inicia la transcripción de los genes situados por detrás del ERG trasplantado.

Las variaciones en las secuencias de nucleótidos de un ERG a otro pueden incrementar o reducir su afinidad por RG y, a su vez, alterar el efecto del RG sobre la transcripción. La doble naturaleza de la secuencia ERG desempeña un papel importante debido a que pares de moléculas RG forman dímeros en los cuales cada subunidad del dímero se une a una mitad de la secuencia de DNA ya indicada (fig. 12-37). Se ha demostrado que la formación de dímeros es una característica común de muchos tipos diferentes de factores de transcripción y, como se estudia más adelante, se cree que desempeñan un papel importante en la regulación de la expresión del gen.

Cada dominio para enlazar DNA de una subunidad RG contiene dos asas helicoidales α orientadas perpendicularmente entre sí. Cada una de las hélices α tiene un ion zinc en su base (esferas de color rosa en la figura 12-37). Cada ion zinc se sitúa en el centro de un complejo formado por cuatro residuos de cisteína acomodados con gran precisión. Puesto que forman asas peptídicas que se prolongan desde la superficie de la proteína, y dado que contienen un ion zinc en su base, estos segmentos helicoidales α se conocen como **dedos de zinc**. Los dos dedos de zinc del RG tienen papeles diferentes. Uno de los dedos de zinc, denominado "hélice de reconocimiento", se prolonga dentro del surco mayor del DNA donde reconoce a la secuencia ERG y se une a ella. El otro dedo de zinc media el enlace a otra molécula del RG para formar un dímero. Como resultado de la dimerización, se prolongan simétricamente dos hélices de reconocimiento dentro de los dos surcos mayores adyacentes del DNA específico, una a partir de cada subunidad del dímero.

Otros factores de transcripción. La comparación de numerosos factores de transcripción reveló que los dominios para enlazar DNA de la mayor parte de los factores de transcripción se pueden agrupar en varias clases extensas cuyos miembros poseen estructuras relacionadas (*motivos*) que interactúan con las secuencias de DNA. La existencia de varias familias de proteínas que pueden enlazarse al DNA indica que la evolución encontró un número diferente de soluciones a los problemas de construir polipéptidos que puedan enlazarse a la doble hélice de DNA. Como veremos pronto, la mayor parte de estos motivos contienen un segmento (a menudo una hélice α , como en la figura 12-37) introducido en el surco mayor del DNA, donde reconocen la secuencia de pares de bases que revisten el surco. El enlace de la proteína al DNA se logra mediante una combinación de fuerzas de van der Waals (hidrofóbicas), enlaces iónicos, y puentes de hidrógeno entre residuos de aminoácidos y diferentes partes del DNA, incluyendo su esqueleto.

Entre los motivos más comunes que ocurren en las proteínas que se enlazan a DNA se encuentran el dedo zinc, la hélice-asa-hélice, el cierre de leucina y el cuadro GME. Cada uno suministra un armazón estructuralmente estable sobre el cual se pueden colocar en posición apropiada las superficies de la proteína que reconocen el DNA específico para interactuar con la doble hélice. Cada motivo puede

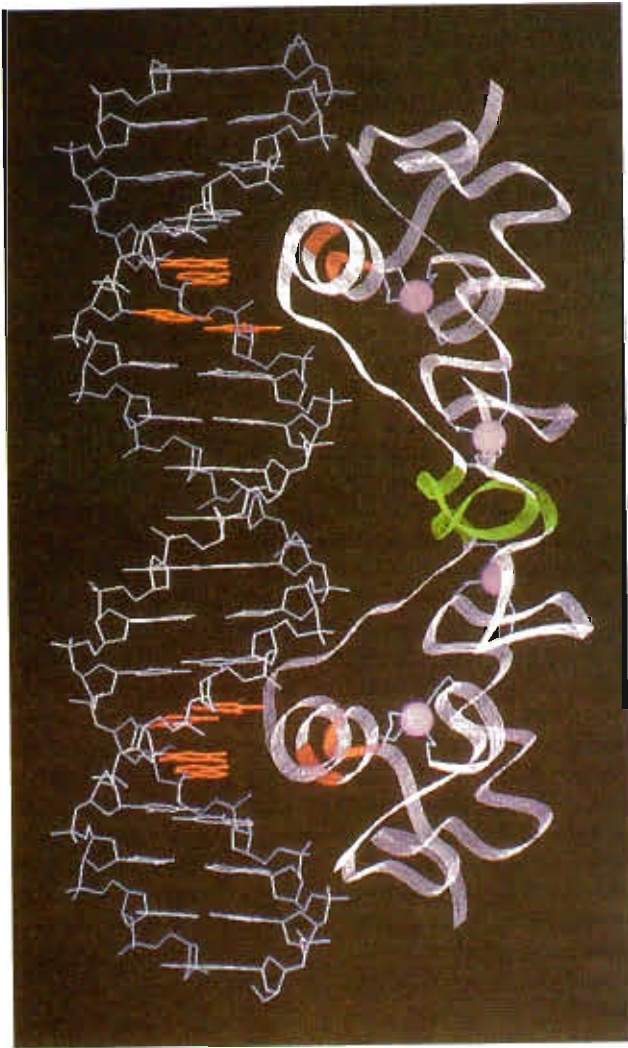
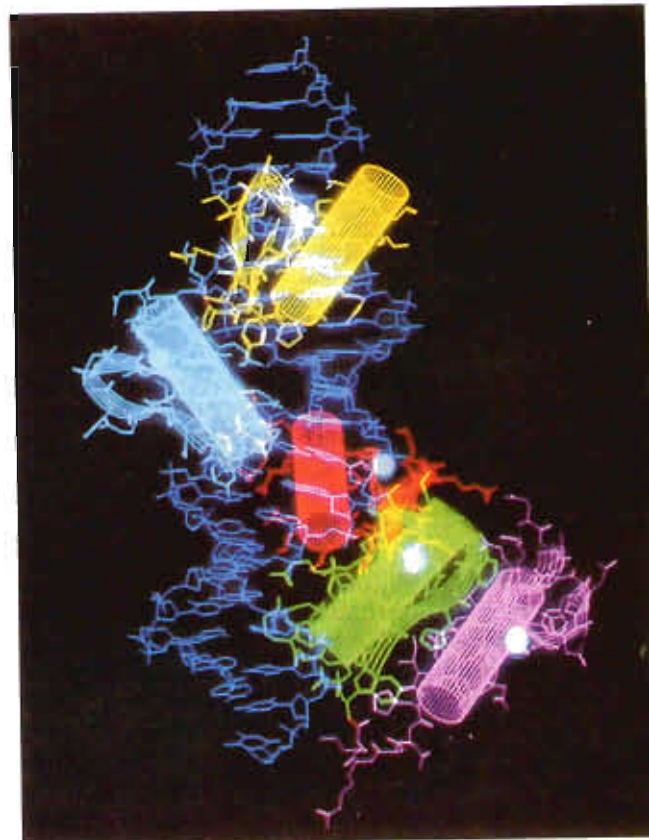


FIGURA 12-37. Interacción entre un factor de transcripción y su secuencia específica de DNA. Modelo de la interacción entre el dominio de enlace de DNA del receptor dimérico para glucocorticoide (GR) y el DNA específico (ERG). En el texto se hizo notar que los receptores para glucocorticoides y estrógenos pertenecen a la misma familia de proteínas. Los residuos del GR esenciales para distinguir entre un elemento de respuesta a glucocorticoides en el DNA y un elemento de respuesta a estrógenos (ERE) se indican en rojo. La porción correspondiente del DNA (representada por dos pares de bases A-T en el centro de la mitad de cada sitio ERG) al cual se enlazan estos residuos también se indica en rojo. Los residuos del segmento mostrado que son importantes para la interacción proteína-proteína se colocan en verde. Los cuatro iones zinc (dos por cada monómero) se muestran como esferas de color rosa. (Reimpreso con permiso de T. Hard y cols., cortesía de Robert Kaptein, *Science* 249:159, 1990; copyright 1990 American Association for the Advancement of Science.)

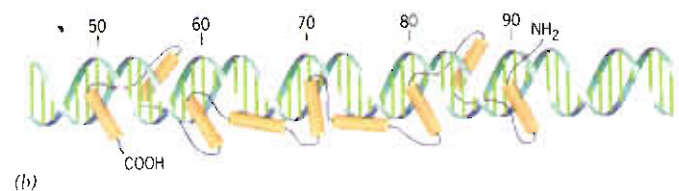
encontrarse en una gran variedad de proteínas que regulan diversos tipos de actividades celulares en organismos que van desde hongos hasta plantas y animales.

1. El motivo dedo de zinc. Como se describió antes, el receptor de glucocorticoides contiene dos dedos de zinc en los cuales se encuentra unido (coordinado) un ion zinc con cuatro residuos de cisteína. Varios factores de transcripción

contienen un tipo de dedo de zinc diferente y evolutivamente no relacionado. En estas proteínas de dedo de zinc, el ion zinc de cada dedo se mantiene en su sitio mediante dos cisteínas y dos histidinas (en vez de las cuatro cisteínas, como en los receptores esteroides). Típicamente, estas proteínas contienen algunos de estos dedos que actúan de manera independiente entre sí y están separados para proyectarse en surcos sucesivamente mayores dentro del DNA específico, como se ilustra en la figura 12-38, *a*. La primera



(a)



(b)

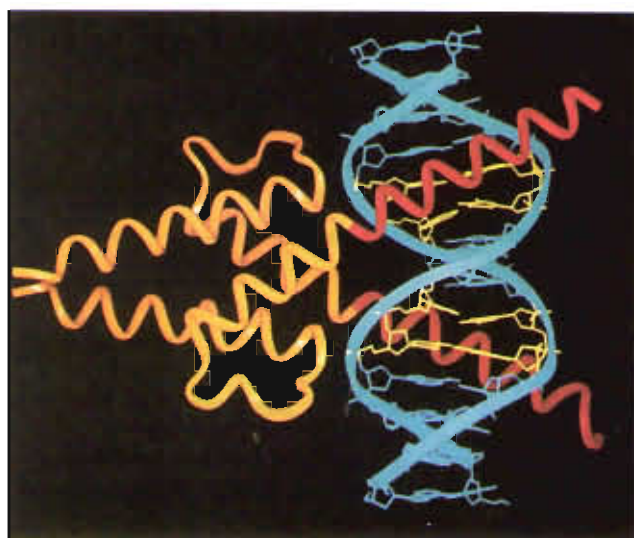
FIGURA 12-38. Factores de transcripción que se enlazan por medio del motivo dedo de zinc. *a)* Modelo del complejo formado entre una proteína con cinco dedos de zinc (llamada GLI) y DNA. Cada uno de los dedos de zinc tiene color diferente; el DNA es de color azul oscuro. Cilindros y cintas resaltan las hélices α y las láminas β , respectivamente. *b)* Modelo del enlace de TFIIIA al DNA del gen de RNAr 5S. Como se hizo notar en el capítulo 11, el promotor del gen RNAr 5S se localiza en el propio gen, en vez de estar en el extremo 5' del flanco. (*a*: Reimpreso con permiso de Nikola K. Pavletich y Carl O. Pabo, *Science* 261:1702, 1993; copyright 1993 American Association for the Advancement of Science; *b*: según K.R. Clemens y cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:10825, 1992.)

proteína de dedo de zinc que se descubrió, TFIIIA (requerida para la transcripción del gen RNAr 5S por la polimerasa RNA III), tiene nueve dedos de zinc (fig. 12-38, b). La comparación de algunas proteínas de dedos de zinc indica que el motivo proporciona el armazón estructural para una gran variedad de secuencias de aminoácidos capaces de reconocer un conjunto diverso de secuencias de DNA.

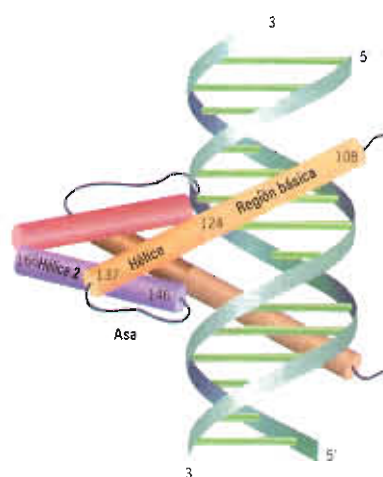
2. El motivo hélice-asa-hélice (HAH). Como su nombre implica, este motivo se caracteriza por dos segmentos helicoidales α separados por un asa interpuesta. El dominio HAH con frecuencia va precedido por un tramo de aminoácidos muy básicos cuya cadena lateral con carga positiva entra en contacto con el DNA y determina la especificidad de la secuencia del factor de transcripción. Las proteínas con este motivo siempre ocurren como dímeros, según se ilustra en el ejemplo del factor de transcripción MyoD en la figura 12-39. Las dos subunidades del dímero de ordinario son codificadas por genes diferentes y por lo tanto la proteína es un heterodímero. La heterodimerización expande ampliamente la diversidad de los factores reguladores que pueden ser generados a partir de un número limitado de polipéptidos (fig. 12-40). Por ejemplo, supongamos que una célula debe sintetizar cinco polipéptidos diferentes que contengan HAH capaces de formar heterodímeros entre sí en cualquier combinación; entonces sería posible formar 32 (2^5) diferentes factores de transcripción que reconozcan 32 diferentes secuencias de DNA. En realidad, las combinaciones entre polipéptidos probablemente estén restringidas, no muy diferente a la formación de moléculas heterodiméricas de integrina (pág. 247).

La heterodimerización también suministra una oportunidad para que una proteína altere las propiedades de otra proteína en relación con su capacidad para enlazarse a DNA. Por ejemplo, una proteína HAH denominada Id carece del tramo de aminoácidos básicos normalmente presentes en estas proteínas y, por consiguiente, no tiene actividad para unirse a DNA. La Id puede enlazarse a otras proteínas HAH y disminuir su afinidad de éstas por la secuencia de DNA que normalmente reconocerían. Id puede desempeñar un papel en el desarrollo embrionario al enlazarse a un factor de transcripción HAH denominado MyoD (mostrado en la figura 12-39, a), que actúa como desencadenante de la diferenciación de las células musculares. La pérdida del Id de las células premusculares puede liberar MyoD de su complejo inhibitor y permitir que active la expresión del gen que inicia la diferenciación de las células musculares. Por lo tanto, la dimerización constituye un mecanismo para regular la actividad de las proteínas cuya función es moderar la expresión de los genes.

Los factores de transcripción que contienen HAH juegan un papel clave en la diferenciación de ciertos tipos de tejidos, incluyendo músculo esquelético. Esto se ilustra en la fotografía de la figura 12-41, que muestra un embrión de ratón transgénico que contiene la región reguladora del gen miogenina colocado por delante de un gen β -galactosidasa bacteriano. Es común emplear el gen β -galactosidasa para probar la expresión de tejidos específicos de un gen porque la presencia de esta enzima se puede revelar fácilmente mediante el color azul producido en una simple prueba histoquímica. En el ejemplo mostrado en la figura 12-41, la



(a)



(b)

FIGURA 12-39. Factor de transcripción con un motivo hélice-asa-hélice (HAH). a) MyoD, un factor de transcripción implicado en el inicio de diferenciación de las células musculares, es una proteína HAH que se enlaza al DNA mediante una región básica acompañante. El sitio de enlace de DNA de 14 pares de bases se muestran en azul ligero, la región básica es roja igual que las cadenas laterales que constituyen contactos específicos para bases y fosfatos del DNA. La región hélice-asa-hélice de MyoD se muestra en amarillo. b) Presentación del complejo dimerico MyoD en la misma orientación que en la parte a. Las hélices α se representan como cilindros. (Según P.C.M. Ma y cols., cortesía de Carl O. Pabo, Cell 77:453, 1994; con permiso de Cell Press.)

síntesis de la enzima bacteriana sólo puede ocurrir después del enlace de factores específicos de transcripción a las regiones reguladoras del gen miogenina, que sólo ocurre en las porciones del embrión (el miotomo de los somitas) que dará lugar a tejido muscular.

Los factores de transcripción que contienen HAH también desempeñan un papel en el control de la proliferación de células y se han implicado en la formación de ciertos tumores cancerosos. En la página 502 se hizo notar que la

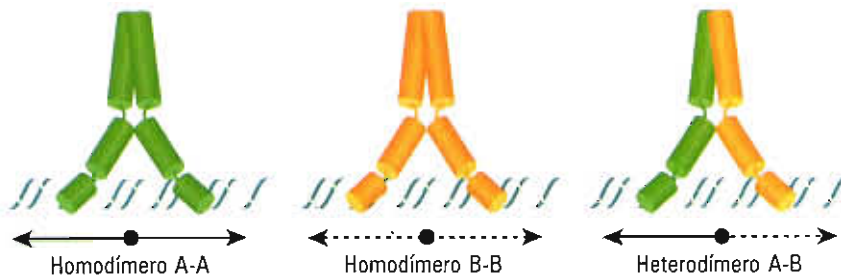


FIGURA 12-40. Incremento de la especificidad de los factores de transcripción para unirse a DNA mediante heterodimerización. En este modelo de una proteína HAH, se pueden formar tres diferentes factores de transcripción dimericos capaces de reconocer distintos sitios de enlace a DNA uniendo las dos subunidades en diversas combinaciones.

translocación de un cromosoma puede producir genes anormales cuya expresión convierte a la célula en cancerosa. En casos de translocación de cromosomas que conducen al desarrollo de cáncer específico se han encontrado genes que codifican cuando menos a cuatro diferentes proteínas HAH (*c-myc*, *SCL*, *LYL-1* y *E2A*). El más prevalente de dichos cánceres es el linfoma de Burkitt, en el cual el gen *c-myc* se transloca a un locus que contiene un gen que codifica parte de una molécula de un anticuerpo.

3. El motivo cierre de leucina (CL). Este motivo debe su nombre a que la leucina aparece cada siete aminoácidos a lo largo de una hélice α de casi 30 a 40 residuos. Puesto

que una hélice α se repite cada 3.5 residuos, todas las leucinas situadas a lo largo de este tramo del polipéptido se enfrentan en la misma dirección. Dos hélices α de este tipo pueden "cerrarse por entrecruzamiento" a todo lo largo de su trayecto para formar una espiral enrollada (pág. 59) en la cual las leucinas de una hélice están presionadas contra las leucinas de la otra hélice. Por lo tanto, igual que la mayor parte de los otros factores de transcripción, las proteínas con un motivo CL existen en forma de dímeros. El motivo CL adquiere su capacidad para unirse al DNA porque posee un tramo de aminoácidos básicos situados a un lado de la hélice α que contiene leucina. Así, igual que las proteínas HAH, las porciones helicoidales α del motivo son importantes en la dimerización, en tanto que un tramo cercano de aminoácidos básicos permite a la proteína reconocer una secuencia específica de nucleótidos en el DNA.

4. El motivo cuadro GME. El "cuadro" GME se denomina así porque fue el primero que se descubrió en un abundante grupo de proteínas denominado grupo de movilidad elevada (GME). El motivo consta de tres hélices α dispuestas en forma de L con dos sitios aparentes para enlazar DNA localizados en el exterior de la L. A diferencia de la mayor parte de los factores de transcripción, que se enlazan al DNA y activan la transcripción interactuando con proteínas situadas a nivel del promotor, los factores de transcripción que poseen cuadros GME activan la transcripción porque deforman el DNA confiriéndole una conformación que incrementa la transcripción. La proteína del GME mejor estudiada se denomina UBF, que activa la transcripción de genes RNAr por la RNA polimerasa I. UBF se enlaza al DNA en forma de dímero cuyas dos subunidades contienen un total de 10 cuadros GME. Mediante su interacción con sitios sucesivos a lo largo del DNA, los cuadros GME deforman la hélice de DNA de tal modo que producen un asa alrededor de la proteína, como se muestra en la figura 12-42. La formación del asa de DNA inducida por UBF trae en estrecha proximidad a dos secuencias reguladoras de DNA que normalmente están separadas por 120 pares de bases en estrecha proximidad que pueden enlazarse para colaborar con un solo factor de transcripción. Por lo tanto, las proteínas del GME actúan ordenando al DNA en disposición espacial particular que incrementa su acceso a otros factores reguladores.



FIGURA 12-41. Demostración experimental de la expresión de tejidos específicos de un factor de transcripción implicado en la diferenciación de células musculares. La activación de la transcripción del gen miogenina ocurre específicamente en aquellas partes del embrión de ratón de 11.5 días de desarrollo que da lugar a tejido muscular. La activación de la transcripción está indicada por las células teñidas de azul empleando una técnica descrita en el texto. (Según T.C. Cheng y cols., cortesía de Eric N. Olson, J. Cell Biol. 119:1652, 1992 con permiso de Rockefeller University Press.)

Represión de la transcripción en eucariotes

Como se puede observar en las figuras 12-27 y 12-28, el control de la transcripción en células procariotas se apoya prin-

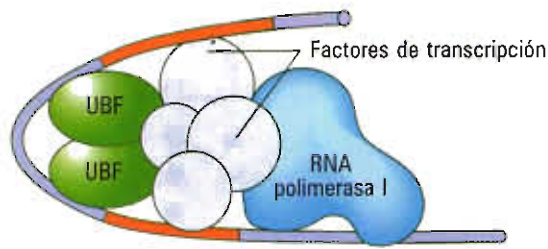


FIGURA 12-42. UBF es un factor de transcripción dímérico que deforma el DNA de tal modo que lo hace una plantilla adecuada para la RNA polimerasa I. El enlace de RNA polimerasa I requiere algunos factores de transcripción basal, no distintos de los requeridos para el enlace de la RNA polimerasa II al cuadro TATA de sus promotores.

principalmente en los represores, o sea, proteínas que se enlazan al DNA e impiden la transcripción del gen cercano. Aunque la investigación en eucariotes se ha enfocado sobre factores que activan o incrementan la transcripción de genes específicos, es evidente que las células eucariotas también poseen mecanismos reguladores negativos. Hay dos maneras distintas de silenciar un gen: secuencias de DNA reguladoras específicas pueden interactuar con proteínas represoras, o el DNA se puede modificar de manera que constituya una plantilla menos adecuada. Algunas de las proteínas reguladoras negativas (p. ej., NC1, NC2, Dr1) se enlazan al promotor e impiden el ensamblado del complejo previo al inicio requerido para comenzar la transcripción (pág. 449). Otros represores se enlazan hacia adelante de las secuencias de DNA e inhiben de alguna manera la transcripción. Así, igual que en los procariotes, el patrón de transcripción de genes particulares en un momento dado de la vida de una célula eucariota puede depender del equilibrio entre factores reguladores de acción positiva y de acción negativa.

En cierto sentido, el estudio de los factores de transcripción es una actividad aparentemente "sin fin". Cuanto más aprendemos acerca de la importancia de estas proteínas reguladoras para controlar la expresión de genes, más im-

portante parece ser el conocimiento del control de su síntesis. Al parecer, los genes que codifican factores de transcripción se controlan a sí mismos por otros factores de transcripción cuya síntesis todavía está controlada por otros factores. Comprender esta cascada de regulación de la transcripción es un desafío formidable, pero los avances hacia dicho objetivo ayudarán a responder muchas preguntas básicas en la biología celular y del desarrollo (véase *La vía experimental* al final de este capítulo).

Papel de la metilación del DNA

En la página 418 se hizo notar que las bacterias añaden grupos metilo a ciertas bases de su propio DNA para protegerlo del ataque de las enzimas de restricción de la propia célula. Las células eucariotas también metilan su DNA, pero una prueba cada vez mayor sugiere que, cuando menos en los vertebrados, la adición de los grupos metilo actúa principalmente para silenciar la transcripción del DNA. El examen del DNA de mamíferos y de otros vertebrados indica que hasta uno de cada 100 nucleótidos posee un grupo metilo añadido, todos ellos fijos al carbono 5 de una citosina. Casi todos los residuos metilcitosina se presentan como parte de un dinucleótido —CG— dentro de una secuencia simétrica como la indicada en la figura 12-43, *a*. Estas secuencias no ocurren al azar en el DNA, sino que tienden a concentrarse en "islotos" ricos en GC, con frecuencia localizados dentro o cerca de regiones reguladoras de la transcripción (fig. 12-43, *b*).

En los vertebrados, la metilación es una modificación dinámica; hay enzimas para eliminar grupos metilo y también para añadirlos. Aunque el patrón promedio de metilación del DNA cambia relativamente poco de un tejido a otro, este patrón de metilación dentro de las regiones reguladoras de genes específicos sometidos a activación durante la diferenciación celular puede cambiar de manera considerable. Estos cambios se pueden ilustrar por un mapa de metilación de una región particular del genoma, como se ilustra en la figura 12-44 con el grupo del gen de la globina β de mamífero.

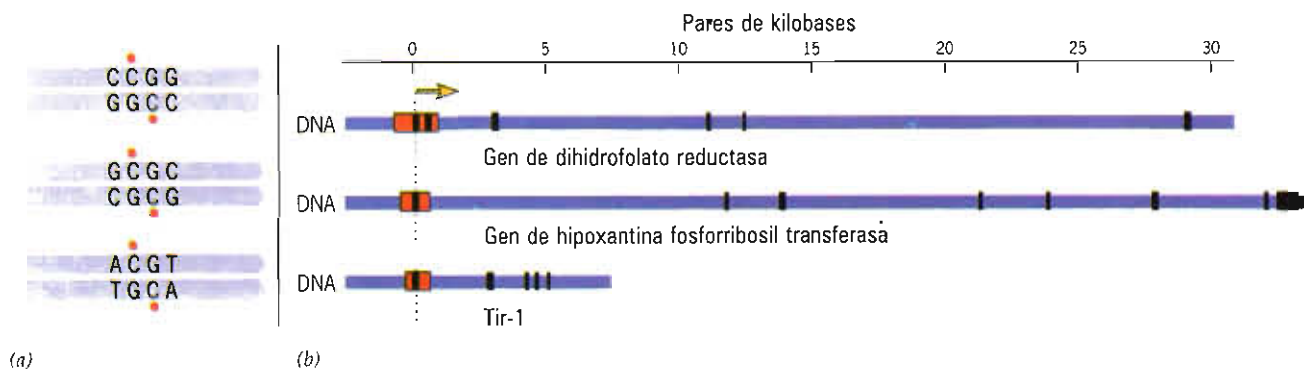


FIGURA 12-43. Metilación del DNA. *a*) Ejemplos de las secuencias de nucleótidos más comúnmente metiladas en el DNA. Los puntos de color indican la posición de los grupos metilo. *b*) Ejemplos de islotos ricos en GC en las regiones promotoras de tres genes de mamífero. La longitud de los islotos se indica por la anchura de los cuadros de color rojo. La anchura de los exones se indica en negro; es evidente que las secuencias interpuestas constituyen la gran masa de cada gen, como habitualmente es el caso. (Según A.P. Bird, Trends Genet. 3:343, 1987.)

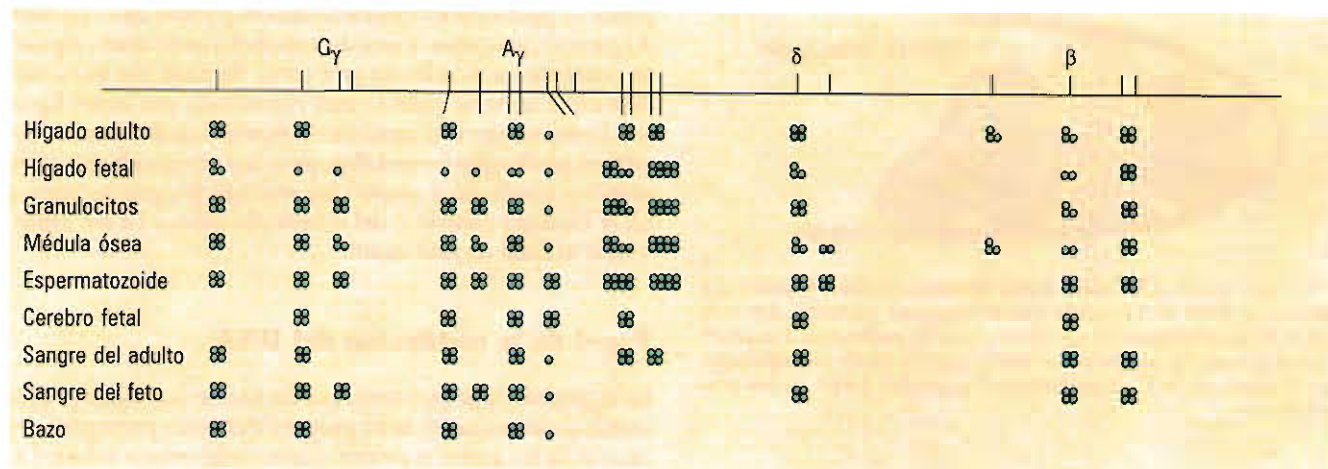


FIGURA 12-44. Medición de los niveles de metilación de la región del gen de la globina β humana en diferentes tipos de células humanas. La figura muestra el mapa de los sitios de desdoblamiento de las enzimas de restricción sensibles a metilación y el nivel aproximado de modificación en cada sitio. Mediante el signo (%%) se indica 100 % de metilación. Los sitios no medidos permanecen vacíos a la izquierda. Nótese que el nivel de metilación del DNA de globina γ es mucho menor en el hígado del feto, el cual transcribe activamente este gen, en comparación con otros tejidos en los cuales este gen permanece silencioso. (Según L.H.T. van der Ploeg y R.A. Flavell, *Cell* 19:956, 1980; con permiso de Cell Press.)

El patrón de expresión de diferentes miembros de la familia del gen de la globina se muestra en la figura 12-45. Se cree que cuando menos algunas de estas diferencias en la secuencia de transcripción del gen de la globina reflejan cambios en los patrones de metilación del DNA. Esta conclusión se basa en la observación de que ciertos sitios específicos en el DNA de genes de transcripción activos es mucho menos probable que sea metilada en comparación con los mismos sitios en el DNA de un tejido en el cual el gen es inactivo. Por ejemplo, el menor nivel de metilación en la región situada por delante del gen de la globina γ en el DNA del hígado fetal comparado con otros tejidos (fig. 12-44) se correlaciona fuertemente con el elevado nivel de transcripción del gen en este tejido particular durante esta etapa del desarrollo (fig. 12-45).

Debemos notar que no todos los genes estudiados muestran esta correlación, lo que indica que la metilación del DNA quizá sólo sea uno de un gran número de mecanismos mediante los cuales se puede inactivar a nivel de

transcripción al DNA. En realidad, la metilación del DNA no está implicada en el control de la expresión de gen en plantas o animales invertebrados. Cualquiera que sea la verdadera importancia de esta modificación química en el material genético de los seres humanos y de otros mamíferos, constituye un estudio de alta prioridad en biología molecular.

La relación entre metilación y actividad del gen se puede estudiar en células tratadas con 5-azacitidina, un compuesto incorporado en el DNA en lugar de la citidina, pero que no puede metilarse. El tratamiento de células con 5-azacitidina puede activar la expresión de genes específicos cuyos productos se relacionan con el tipo de célula tratada. Por ejemplo, el tratamiento de leucocitos malignos en cultivo de células da como resultado la desmetilación de los genes de la globina inactivados y su transcripción subsecuente. Estos datos condujeron a ensayos clínicos de la 5-azacitidina como tratamiento para pacientes afectados de leucemia mieloide aguda, enfermedad caracterizada por la

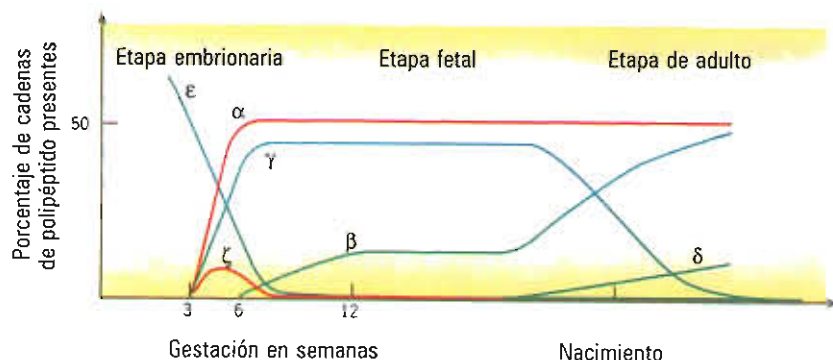


FIGURA 12-45. Transcripción de diferentes miembros de la familia de genes de globina en diferentes etapas del desarrollo humano. Las moléculas de hemoglobina se forman por la asociación de dos globinas similares α con dos globinas similares β . Los diferentes miembros de cada una de estas dos subfamilias se sintetizan en diferentes etapas de desarrollo, según se indica en la figura. La expresión de los genes de globina similares α se indica por líneas rojas, y la de los genes de globina similares β se indica por líneas azules.

proliferación descontrolada de las células sanguíneas. La administración de 5-azacitidina conduce a la activación del gen, esto a su vez provoca que los precursores de células sanguíneas malignas dejen de proliferar y sufran la diferenciación celular, que finalmente les causa la muerte. Estudios preliminares sugieren que el fármaco es capaz de provocar remisiones de la leucemia en algunos pacientes y normalizar el perfil de células sanguíneas.

También se emplea la azacitidina en el tratamiento de pacientes con β -talasemia, enfermedad de las células sanguíneas caracterizada por síntesis insuficiente de globina β , uno de los dos polipéptidos presentes de ordinario en la hemoglobina de los adultos. La incorporación de 5-azacitidina en el DNA de estos pacientes produjo la desmetilación y activación de sus genes de globina γ , genes previamente activos en el feto (fig. 12-45). Como resultado, los eritrocitos se llenan de hemoglobina fetal (compuesta de dos cadenas de globina γ y dos cadenas de globina α), capaz de satisfacer las necesidades de transporte de oxígeno del individuo.

La mayor parte de las pruebas sugieren que la metilación del DNA sirve más bien para mantener un gen en estado inactivo que como mecanismo para iniciar la inactivación. Por ejemplo, la inactivación de los genes sobre uno de los cromosomas X de los mamíferos hembra (pág. 500) ocurre *antes* que una onda de metilación del DNA pueda convertir al DNA en estado más permanentemente inactivado. La metilación puede inhibir la transcripción al interferir en la capacidad de los factores de transcripción para reconocer los sitios donde se enlazan al DNA, o alterando la conformación del DNA de tal modo que haga a las plantillas menos adecuadas para la RNA polimerasa.

Uno de los ejemplos más espectaculares de la importancia de la metilación en la expresión de genes ocurre durante el fenómeno de impresión genómica.

Impresión genómica. Hasta mediados del decenio de 1980 se había asumido que el conjunto de cromosomas heredados del progenitor masculino era funcionalmente equivalente al conjunto correspondiente de cromosomas heredados del progenitor femenino. Pero, igual que muchas otras suposiciones aceptadas durante largo tiempo, se demostró que ese no era el caso. Más bien, ciertos genes son activos o inactivos durante las etapas tempranas del desarrollo dependiendo únicamente de haber sido llevadas al cigoto por el espermatozoide o por el óvulo. Por ejemplo, durante el desarrollo temprano del ratón, el gen que codifica una proteína llamada factor de crecimiento parecido a insulina 2 (FCI2) sólo es activo sobre el cromosoma transmitido por el progenitor masculino, en tanto que el gen que codifica al receptor de esta proteína (una proteína denominada FCI2R) sólo es activo sobre el cromosoma transmitido por el progenitor femenino. Se dice que los genes de este tipo serán **marcados** según el origen de sus progenitores. Los estudios sugieren la existencia de cuando menos 100 genes dentro del genoma del mamífero sometidos a este tipo de expresión diferencial.

Las versiones inactivas y activas de los genes marcados difieren en su patrón de metilación. En algunos casos, la versión poco metilada del gen es la activa, en tanto que en otros, el gen que contiene grupos metilo adicionales es el activo y la versión poco metilada es silenciosa a nivel de

transcripción. Se cree que las diferencias entre alelos maternos y paternos en las células de un embrión se originan durante la formación de los gametos en el progenitor. Debe haber algunos mecanismos mediante los cuales genes específicos (p. ej., FCI2R) son señalados para la inactivación durante la formación del espermatozoide, en tanto que otros genes (p. ej., FCI2) son marcados para inactivación durante la formación del óvulo.

¿Cuál es el posible papel que la impresión genómica puede desempeñar en el desarrollo de un embrión? La respuesta probablemente sea: ninguno. En la página 418 se hizo notar que las bacterias usan la metilación para proteger a la célula de virus invasores. La metilación también puede desempeñar un papel para proteger células eucariotas de la infección viral. Por ejemplo, cuando se introducen genomas de retrovirus en ciertas células, se convierten en células fuertemente metiladas. Es posible que dichos genes metilados durante la formación del gameto se sitúen en una región del genoma reconocida como DNA extraño por los mecanismos de defensa del cuerpo. Por lo tanto, la metilación de ciertos genes durante la formación del gameto puede tener su origen en un "accidente". En realidad, ciertos genes marcados en ratones (p. ej., FCI2R) no están marcados en el hombre, lo que sugiere que no hay una razón básica para que estos genes particulares deban expresarse diferencialmente en el embrión.

Estructura y transcripción de la cromatina

Según la explicación en la página 495, el DNA de un núcleo eucariota no se presenta en forma descubierta, sino que está rodeado por complejos de histona para formar nucleosomas. El descubrimiento de los nucleosomas en el decenio de 1970 planteó una pregunta importante que todavía no se ha resuelto satisfactoriamente: ¿de qué manera las proteínas no de histona (como los factores de transcripción y las RNA polimerasas) pueden interactuar con el DNA estrechamente relacionado con núcleos centrales de histona? En realidad, múltiples pruebas sugieren que la incorporación del DNA en los nucleosomas *inhibe* la transcripción del DNA, al menos cuando se practica el ensayo *in vitro*. Sin embargo, al mismo tiempo es evidente que se puede transcribir el DNA incluso cuando forma complejos con histona. Los intentos para explicar esta aparente contradicción sólo han tenido éxito limitado. El siguiente es un breve resumen del estado actual de nuestro conocimiento.

La posición precisa de los nucleosomas dentro de la región reguladora de un gen casi siempre desempeña un papel clave para permitir que las proteínas que se enlazan a DNA estimulen la transcripción de dicho gen. En la página 496 se hizo notar que los nucleosomas no están presentes al azar a lo largo del DNA, sino que a menudo se sitúan en sitios particulares. Como resultado, se cree que ciertas secuencias clave reguladoras de DNA residen en sitios fijos en relación con las partículas centrales del nucleosoma de la vecindad. Una secuencia particular de DNA, como un amplificador, puede residir al parecer entre dos partículas centrales del nucleosoma y por lo tanto permanece accesible para el enlace de un factor de transcripción (fig. 12-46, a).

Aun si un segmento de DNA rodea al núcleo de histona, se puede predecir que algunas partes de dichos segmen-

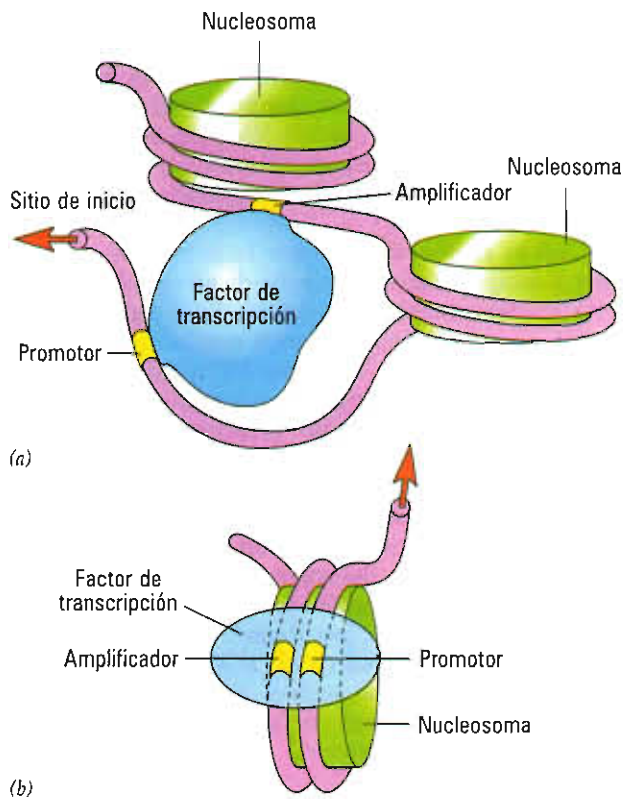


FIGURA 12-46. Papel del posicionamiento del nucleosoma para facilitar la transcripción. *a)* En este caso, el nucleosoma se coloca en una posición de modo que los elementos reguladores claves del gen permanecen fuera de la partícula central y disponibles para enlazarse a los factores de transcripción. *b)* En este caso, los elementos reguladores se localizan en el DNA que rodea las histonas centrales. Gracias a estas histonas, los elementos reguladores clave del DNA entran en estrecho contacto y pueden unirse a un factor de transcripción.

tos residen sobre la superficie interior de la doble hélice que enfrentan las moléculas de histona, en tanto que otras partes de ese segmento posiblemente residan en la superficie exterior del doblete que enfrenta la solución que lo rodea (fig. 12-11). Las secuencias de DNA que se alejan del núcleo de histona deben ser accesibles para la interacción con factores de transcripción. En realidad, el enrollamiento de casi 150 pares de bases de DNA alrededor del núcleo de histona es un medio para llevar en estrecha proximidad a dos elementos de control específicos sobre el DNA que normalmente se encuentran separados, y gracias a esta proximidad pueden interactuar de manera cooperativa con uno o más factores de transcripción (fig. 12-46, *b*). Por lo tanto, en algunos casos los nucleosomas pueden realmente desempeñar un papel activo para promover la interacción entre el DNA y una proteína reguladora. Dadas estas diferentes posibilidades, se puede pensar que la posición del nucleosoma desempeña otro papel para las secuencias del DNA además de codificar la información genética y de enlazar factores de transcripción. Así como la secuencia primaria de una proteína contiene la información para su propio plegamiento,

la secuencia primaria del DNA contiene al parecer la información para la posición de ciertos nucleosomas clave.

Lo mismo que otras partes de la célula, la cromatina no es una estructura estática sino más bien activa, un complejo dinámico de proteínas y ácidos nucleicos capaces de ser "remodelados". Cuando una proteína reguladora se enlaza en un sitio específico de la cromatina del DNA, sea entre los nucleosomas o en un nucleosoma, es probable que induzca cambios secundarios en la estructura de la cromatina para hacer más o menos accesibles otros sitios a la unión de proteínas subsecuentes. Los datos indican que la influencia de una proteína reguladora de gen enlazada a un sitio sobre el DNA se puede sentir a una distancia considerablemente alejada. Por ejemplo, el enlace de un factor de transcripción específico a una secuencia amplificadora localizada lejos de un gen puede facilitar el ensamblado de un complejo de preinicio en el cuadro TATA localizado muy cerca del gen. Una vez ensamblado, el complejo de preinicio puede servir como blanco para los factores de transcripción que se enlazan a otra secuencia reguladora. Como resultado de acontecimientos sucesivos de este tipo, una región particular de la cromatina se convierte de región inactiva a región activa a nivel de transcripción.

La cromatina activa a nivel de transcripción posee ciertas propiedades distintivas que la distinguen de la cromatina inactiva. Por ejemplo, la cromatina activa es más accesible a los agentes externos, incluyendo enzimas que digieren DNA, como la DNasa I, capaz de desdoblar el DNA en ciertos sitios. Estos *sitios hipersensibles a DNasa I*, como se les denomina, típicamente residen en las regiones reguladoras de genes que son activamente transcritos, pero están ausentes de estas mismas regiones de genes que son silenciosos a nivel de transcripción. Se asume que los sitios hipersensibles son regiones de DNA donde los nucleosomas fueron desplazados, y por lo tanto, están disponibles para interactuar con proteínas reguladoras de genes (fig. 12-47).

En general, se concuerda que el inicio de la transcripción se acompaña de cambios estructurales en la cromatina que aloja una secuencia reguladora de un gen, pero hay menos concordancia acerca de los cambios de la cromatina dentro del propio gen. En ciertos casos, donde un gen se transcribe muy activamente, como en el caso de los genes de RNAr durante la oogénesis de los anfibios, el DNA aparece desprovisto de nucleosomas (como en la figura 11-11). Sin embargo, la mayor parte de los genes cuya transcripción se ha examinado al microscopio electrónico parece retener sus nucleosomas (fig. 12-48) a pesar del desplazamiento de moléculas de RNA polimerasa a lo largo del trayecto del DNA. La RNA polimerasa es una molécula enorme, regularmente el doble de la masa de un nucleosoma entero, y se enlaza a unos 50 pares de bases de DNA, parte de los cuales tienen que ser desenrollados. Parece poco probable que esta actividad pudiera ocurrir sobre una plantilla de DNA firmemente enlazada a la superficie de una partícula central intacta del nucleosoma. Para continuar con la expectativa, considerables datos sugieren que los nucleosomas situados en una región de transcripción sufren modificaciones que hacen más accesible el DNA tanto a moléculas de polimerasa como a factores de transcripción. Esto puede ocurrir por la destrucción del octámero histona conforme se desplaza

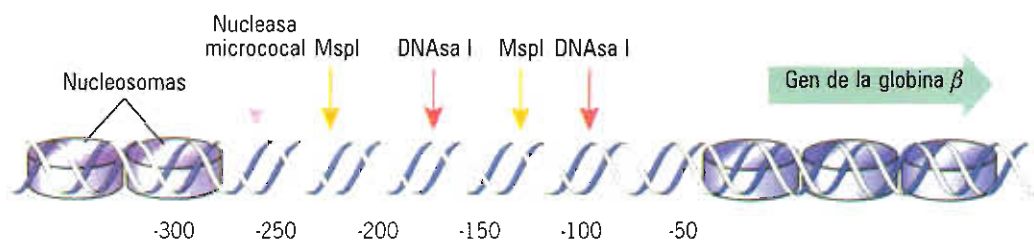


FIGURA 12-47. Se supone que sitios hipersensibles a nucleasa se localizan en regiones más accesibles a enzimas. La cromatina de la región del gen de la globina β del pollo presenta un sitio hipersensible localizado por delante (de -70 a -270) de la región codificante, susceptible a ser digerida por varias nucleasas. Aunque el sitio aquí mostrado está desprovisto de nucleosomas, los datos sugieren que algunos sitios hipersensibles pueden asociarse más laxamente a los nucleosomas. (Según B. Lewin, *Genes V*, p. 829, Oxford University Press, 1994.)

la polimerasa y por la reconstitución del nucleosoma luego que ha pasado la enzima (fig. 12-49).

Otra manera de reestructurar el nucleosoma es añadiendo grupos acetilo a los residuos lisina del núcleo central de las histonas en regiones de cromatina activamente transcrita. Puesto que las cadenas laterales de lisina acetilada ya no poseen carga positiva, podría esperarse que perdieran su "agarre" sobre el DNA adyacente. Uno de los ejemplos más espectaculares de la correlación entre actividad de transcripción y acetilación del núcleo central de la histona se puede observar comparando el cromosoma X activo de células femeninas, que contiene histonas acetiladas, con los cromosomas X inactivos, cuyas histonas prácticamente se encuentran libres de esta modificación química (fig. 12-50).

Regulación del alargamiento de la transcripción

Aunque el inicio de la transcripción es el sitio primario de la regulación de la expresión de genes, también se han descubierto mecanismos que controlan el alargamiento de la transcripción. El movimiento de una molécula de RNA polimerasa a lo largo del DNA no ocurre con velocidad uniforme;

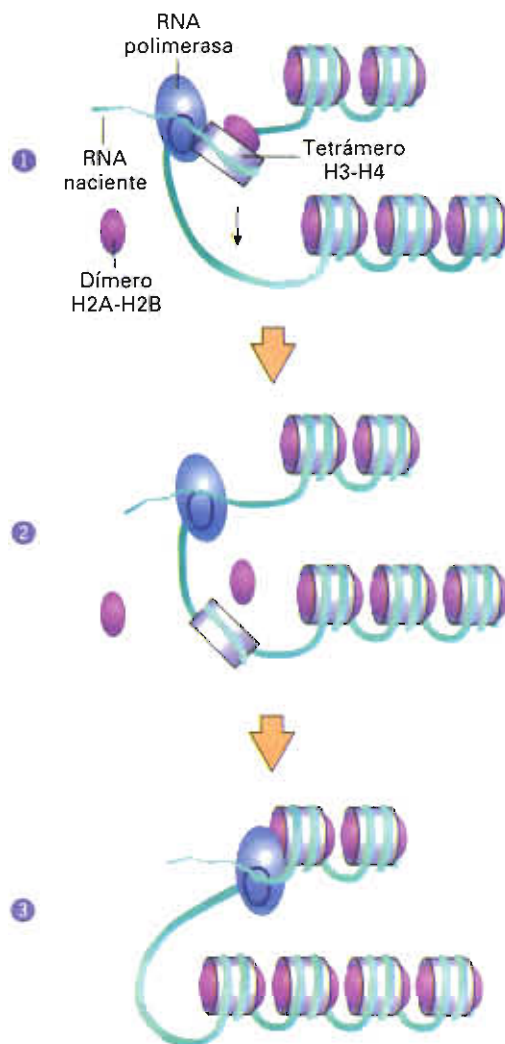


FIGURA 12-49. Modelo para la transcripción a través de las partículas centrales del nucleosoma. En el paso 1, la RNA polimerasa desestabiliza al nucleosoma formando un complejo que desplaza la mitad de las histonas (los dos dímeros H2A-H2B) que constituyen la partícula central. En el paso 2, la otra mitad de la histona central (tetrámero H3-H4) se desplaza con las histonas que son transferidas sobre el DNA libre que deja la polimerasa. En el paso 3, los dímeros H2A-H2B se vuelven a juntar al DNA para formar una partícula central completa del nucleosoma. (Según C.D. Adams y J.L. Workman, *Cell* 72:307, 1993; con permiso de Cell Press.)

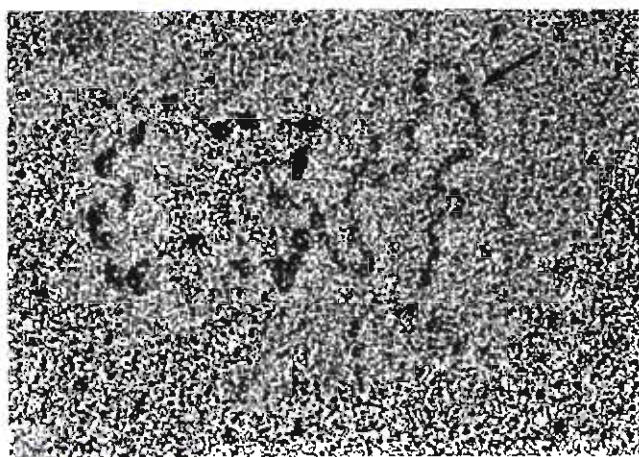


FIGURA 12-48. Demostración de la transcripción del DNA en una región que contiene nucleosomas. Este minicromosoma SV40 contiene nucleosomas, que se observan como esferas de color oscuro, y también una cadena de RNA naciente (flecha) indicando que el DNA es transcrito por una RNA polimerasa. (Cortesía de Pierre Chambon.)



FIGURA 12-50. Demostración experimental de una correlación entre actividad de transcripción y acetilación de las histonas. Este cromosoma de la metafase esparcido fue doblemente marcado con anticuerpos fluorescentes para: 1) histona acetilada H4, que presenta fluorescencia verde, y 2) bromodesoxiuridina (BrdU), que muestra fluorescencia roja. Como se estudia en el siguiente capítulo, la BrdU es un análogo de la timidina que se incorpora al DNA durante la duplicación. El cromosoma X inactivado se duplica más tarde en la fase S del ciclo celular, de modo que se puede marcar selectivamente con BrdU, como se hizo aquí. Es evidente que todos los cromosomas, excepto el X inactivado, se tiñen brillantemente con el anticuerpo contra histona acetilada. (Según P. Jeppesen y B.M. Turner, *cover of Cell* vol. 74, no. 2, 1993, cortesía de Peter Jeppesen; con permiso de Cell Press.)

hay ciertas secuencias que reducen la velocidad de la polimerasa e incluso la detienen durante breves periodos. Se han identificado factores de transcripción que favorecen el paso de la enzima sobre estas “piedras del camino” o, alternativamente, la liberación prematura de la polimerasa de la plantilla de DNA (y por lo tanto la conclusión del ensamblado del RNA naciente). El factor de alargamiento TFIIS (fig. 11-20) parece promover el paso de la polimerasa sobre dichos sitios desdoblado los nucleótidos desde el extremo 3' del transcrito naciente, y provocando objetivamente el movimiento de la polimerasa varios pasos hacia atrás a lo largo de la plantilla y luego otra vez hacia adelante.

Control a nivel de procesamiento

A través de este libro hemos visto que las proteínas con frecuencia son codificadas por miembros de una familia de multigenes. Se supone que los diferentes genes que componen una familia de multigenes se originaron durante la evolución de un solo gen ancestral que sufrió duplicaciones repetidas. Con el tiempo, los duplicados sufrieron divergencia de secuencias, generando una familia de genes que codifican proteínas homólogas con funciones relacionadas. La formación de una familia de multigenes es un “mecanismo” evolutivo que genera gran diversidad de proteínas, las cuales también puede ser generadas dentro de un organismo individual mediante un proceso denominado **empalme alternativo**, que regula la expresión de un gen a nivel de procesamiento del RNA.

El empalme alternativo es un mecanismo muy difundido mediante el cual un solo gen puede codificar dos o más proteínas relacionadas. Como se comentó en el capítulo previo, la mayor parte de los genes (y por lo tanto sus transcritos primarios) contienen numerosos intrones y exones. En muchos casos, hay más de una vía para procesar un transcrito primario particular. En el caso más sencillo, un intrón específico puede ser empalmado fuera del transcrito o retenido como parte del RNAm final. Un ejemplo de este tipo de empalme alternativo se observa durante la síntesis de la fibronectina, una proteína observada en el plasma sanguíneo y en la matriz extracelular (pág. 243). La fibronectina producida por los fibroblastos y retenida en la matriz contiene dos péptidos “extra” en comparación con la versión de la proteína producida por las células hepáticas y secretada en el plasma (fig. 12-51). Los péptidos extra son codificados por porciones del precursor RNAm retenidas durante el procesamiento en el fibroblasto pero eliminadas durante el procesamiento en la celdilla hepática.

Hay un gran número de otros tipos de patrones de empalme alternativo. En algunos casos, un transcrito primario puede contener secuencias terminales alternas 5' o 3'. Por ejemplo, las células productoras de anticuerpos pasan por una etapa temprana de diferenciación en la cual el anticuerpo producido se encuentra integrado a su membrana plasmática. En etapa tardía, el linfocito diferenciado secreta a la sangre un anticuerpo con el mismo sitio de combinación idéntico. Estas dos formas del anticuerpo, el originado en la sangre y las formas enlazadas a la membrana, tienen aminoácidos diferentes en un extremo del polipéptido según cuál de los dos exones 3' alternativos fue incluido en el mensaje durante el procesamiento del RNA (fig. 12-52).

El empalme alternativo puede ser muy complejo, lo que permite que las células “elijan” entre una gran variedad de diferentes combinaciones de posibles exones. El mecanismo de la célula por el cual selecciona exones alternos

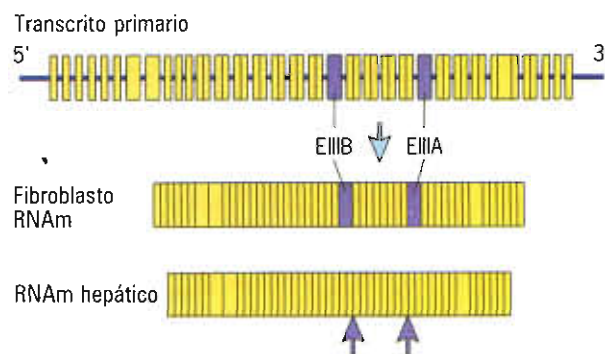


FIGURA 12-51. Empalme alternativo de la fibronectina RNAm. El gen consta de algunos exones mostrados en el dibujo de arriba (los intrones mostrados en negro no se dibujaron a escala). Dos de estos exones codifican partes del polipéptido denominado EIIIA y EIIIB, incluidos en la proteína producida por fibroblastos pero excluidos de la proteína producida en el hígado. La diferencia se debe al empalme alternativo; aquellas partes del pre-RNAm que codifican estos dos exones están seccionadas del transcrito en las células hepáticas. Los sitios de los exones perdidos se indican por las flechas en el RNAm del hígado.

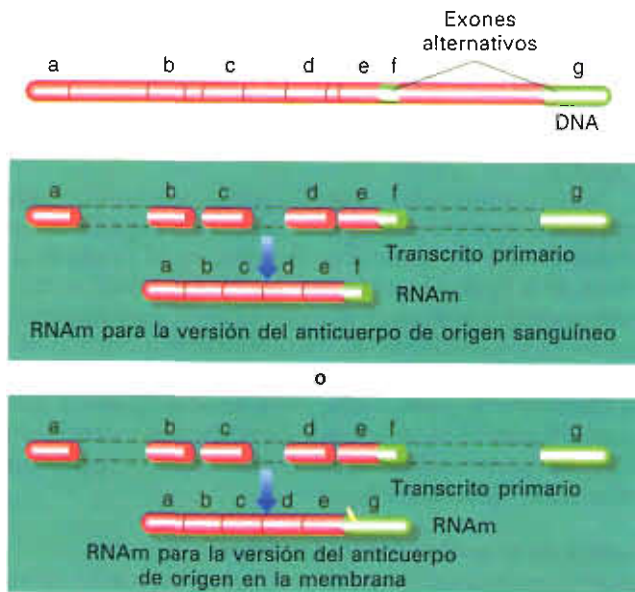


FIGURA 12-52. Empalme alternativo de genes que codifican anticuerpos. Anticuerpos con el mismo sitio para combinarse con antígenos pueden presentarse en dos formas: como proteínas solubles de origen sanguíneo o como proteínas enlazadas a la membrana plasmática de un linfocito B. La secuencia de aminoácidos de las dos formas del anticuerpo difiere en un extremo de la molécula. Estas diferencias ocurren debido a que las dos formas de polipéptidos se sintetizan en diferentes RNAm derivados del mismo transcrito primario por procesamiento alternativo. El exón marcado como f se incorpora al RNAm que codifica la versión de origen sanguíneo del anticuerpo, en tanto que un exón alternativo (g) se incorpora al RNAm para la versión enlazada a la membrana.

para incluir o excindir todavía no está claro. La elección depende principalmente de que un sitio de empalme específico 3' o 5' sea reconocido por el mecanismo de empalme como sitio de desdoblamiento (pág. 459). Se han identificado varias proteínas que parecen regular la elección del sitio de empalme, y se está investigando su mecanismo de acción. Este mecanismo desempeña claramente un papel importante en la regulación de la expresión genética. En la mayor parte de los casos, las proteínas producidas por determinado gen mediante empalme alternativo son idénticas a lo largo de la mayor parte de su trayecto, pero difieren en regiones claves que pueden afectar propiedades tan importantes como su localización en la célula, el tipo de ligandos que pueden enlazar, o la cinética de su actividad catalítica. Algunos factores de transcripción se producen en genes que pueden ser ensamblados alternativamente; la producción de una u otra variante de proteína reguladora puede determinar la vía de diferenciación adoptada por las células. En la mosca de la fruta, por ejemplo, la vía de desarrollo que conduce al embrión a convertirse en masculino o femenino es determinada por el ensamblado alternativo de transcritos de ciertos genes importantes desde el punto de vista del desarrollo.

Aunque el empalmado alternativo es la forma mejor estudiada de control a nivel de procesamiento, no es el único tipo. Estudios iniciales sobre el RNA nuclear sugirieron que

una fracción cuantificable de los RNAm que normalmente sintetizan las células es desdoblada por completo dentro del núcleo y por lo tanto no da lugar a RNAm maduro. Los investigadores nunca fueron del todo claros acerca de este asunto porque es difícil determinar si un transcrito específico es degradado por completo o sólo parcialmente. Sin embargo, estudios recientes sugieren que las células pueden ser capaces de controlar que un transcrito primario sea o no procesado. Este mecanismo regulador se puede ilustrar por el ejemplo de una proteína llamada U1A, una de las proteínas que se enlaza a U1 RNAnp durante el ensamblado del RNA (pág. 461). Cuando las células se manipulan genéticamente para que sobreexpresen la proteína U1A, la cantidad de RNAm que codifica esta proteína disminuye. Un análisis adicional indica que la proteína se enlaza a ciertas secuencias en pre-RNAm específico que contiene el mensaje U1A e inhibe la poliadenilación del pre-RNAm. Sin el apéndice poli(A), el mensaje se descompone con rapidez. Por lo tanto, la proteína U1A al parecer regula la producción de su propio RNAm enlazándose a su precursor RNAm y alterando el curso de las modificaciones postranscripción.

Control a nivel de la traducción

El control a nivel de la traducción incluye una variedad de mecanismos reguladores que afectan la traducción del RNAm previamente transportado desde el núcleo del citoplasma. Los temas considerados bajo este mecanismo regulador general incluyen: localización del RNAm en ciertos sitios dentro de la célula; capacidad de una célula para controlar si un RNAm es traducido o no y, en caso afirmativo, con qué frecuencia; y longevidad del RNAm, propiedad que determina la duración de la traducción del mensaje.

Los mecanismos de control a nivel de traducción generalmente operan a través de interacciones entre RNAm específicos y varias proteínas presentes en el citoplasma. En la página 451, se hizo notar que los RNAm contienen segmentos no codificantes, denominados **regiones no traducidas (RNT)**, en ambos extremos 5' y 3'. Las RNT 5' se extienden desde el casquete de metilguanosina al inicio del mensaje hasta el codón de inicio AUG, en tanto que las RNT 3' se extienden desde el codón de terminación en el extremo de la región codificante al extremo del apéndice poli(A) fijo a casi todo el RNAm eucariota (fig. 11-21). Durante muchos años las secciones no traducidas del mensaje fueron ignoradas ampliamente, pero en la actualidad hay datos de que las RNT son los sitios donde la célula enfoca la mayor parte de sus esfuerzos para controlar la traducción.

Localización de los RNAm dentro del citoplasma

La información requerida para iniciar la formación de un embrión en un óvulo animal fertilizado se establece dentro del oocito durante la ovogénesis. Por ejemplo, en la mosca de la fruta, un extremo del óvulo da lugar a la cabeza y otras estructuras anteriores, en tanto que el extremo opuesto del óvulo genera la parte posterior del embrión y también el tejido gonadal (fig. 12-53). El desarrollo del eje anteroposterior del embrión y posteriormente del adulto está sombreado

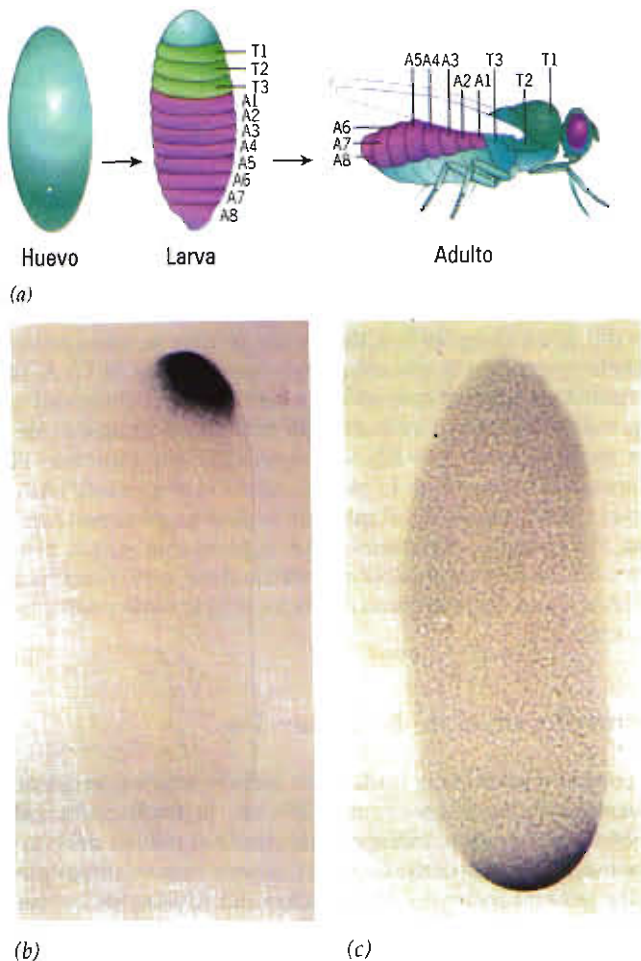


FIGURA 12-53. Localización del RNAm en el citoplasma del huevo de *Drosophila*. a) Dibujo esquemático que muestra tres etapas en la vida de una mosca de la fruta: huevo, larva y adulto. Se indican los segmentos del tórax y el abdomen. b) Localización del RNAm *bicoide* en el polo anterior de una primera etapa de desdoblamiento del embrión de *Drosophila* mediante hibridación *in situ*. c) Localización del RNAm *oskar* en el polo posterior de una etapa comparable a la mostrada en b. Ambos RNA localizados desempeñan un papel importante en el desarrollo del eje anteroposterior de la mosca de la fruta. (b: Cortesía de Daniel St. Johnson; c: cortesía de Antoine Guichet y Anne Ephrussi.)

do hacia adelante por la localización del RNAm específico a lo largo de este mismo eje en el óvulo. Por ejemplo, el RNAm transcrito del gen *bicoide* se localiza en particular en el extremo anterior del óvulo, en tanto que el RNAr transcrito del gen *oskar* se halla en el extremo opuesto (fig. 12-53, b,c). La proteína codificada por el RNAm *bicoide* desempeña un papel crítico en el desarrollo de la cabeza y el tórax, en tanto que la proteína codificada por el RNAm *oskar* es necesario para la formación del abdomen y las células germinales.

La información que gobierna la localización citoplásmica de un RNAm se localiza en la RNT 3'. Esto se puede demostrar utilizando la mosca de la fruta portadora de un gen extraño cuya región codificadora está acoplada a una secuencia de DNA que codifica la RNT 3' del RNAm *bicoide*

u *oskar*. Cuando se transcribe el gen extraño durante la ovogénesis, el RNAm se localiza en el sitio determinado por la RNT 3'. Aunque el mecanismo de localización del RNAm todavía no está bien comprendido, se cree que es mediado por proteínas que reconocen secuencias de localización en el RNAm.

Tanto microtúbulos como filamentos de actina han sido implicados en el control de la organización espacial de los RNAm en el citoplasma. Por ejemplo, en el óvulo de la mosca de la fruta, el transporte del RNAm *bicoide* se interrumpe mediante agentes que provocan la despolimerización de los microtúbulos. En los fibroblastos humanos, casi 75% del RNAm poli(A) del citoplasma se puede localizar en los filamentos de actina o muy cerca de ellos. Como se ilustra en la figura 12-54, muchas de las moléculas individuales de RNAm se encuentran en la intersección entre filamentos del armazón citoesquelético.

Control de la traducción de los RNAm

Los RNAm almacenados en el huevo no fertilizado son plantillas para proteínas sintetizadas durante las etapas tempranas del desarrollo y, por lo tanto, no se utilizan para la síntesis de proteínas en el propio huevo. Los RNA mensajeros almacenados en el huevo para uso posterior con frecuencia se refieren como RNAm "enmascarados", debido a que se encuentran inactivos por asociación con proteínas inhibidoras. Consideremos el caso del huevo no fertilizado



FIGURA 12-54. Localización del RNAm para filamentos de actina en el citoplasma. Los puntos negros en esta micrografía electrónica son partículas de oro en un sitio de intersección entre filamentos de actina donde se localiza una molécula de RNAm poli(A). Para obtener esta micrografía se extrajeron fibroblastos humanos con el detergente no iónico Tritón X-100 y luego se incubaron con una sonda oligo dT unida a biotina. Las moléculas oligo dT se enlazan específicamente a los apéndices poli(A) del RNAm y luego se localizan al incubar la preparación con un anticuerpo de conejo contra biotina. Los sitios del RNAm citoplásmico se vuelven visibles incubando la preparación con un anticuerpo de cabra marcado con otro que se enlaza al anticuerpo de conejo en el complejo anticuerpo-biotina-oligo dT. (Según Gary J. Bassell y cols. J. Cell Biol. 126:869, 1994; con permiso de Rockefeller University Press.)

del erizo de mar. Cuando se incubaba una suspensión de estos huevos con aminoácidos marcados con isótopos radiactivos, muy poca radiactividad se incorpora a la proteína (fig. 12-55, a). Sin embargo, si se fertiliza esta misma preparación de huevos añadiendo espermatozoides, la incorporación de aminoácidos marcados es cuantificable, y la tasa de incorporación se eleva lentamente en las siguientes horas (fig. 12-55, a) y a continuación la concentración decrece confor-

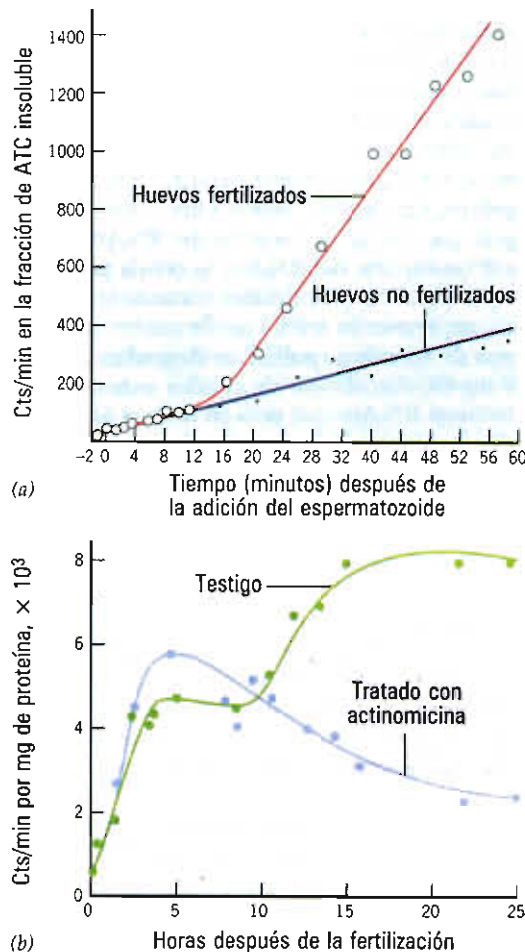


FIGURA 12-55. Demostración experimental de la activación de RNAm "enmascarado" luego de la fertilización de los huevos del erizo de mar. *a*) Incorporación acumulativa de ^{14}C -leucina por huevos fertilizados y no fertilizados del erizo de mar. El tiempo cero marca el punto de fertilización, que va seguido después de un breve retardo por una marcada elevación de la tasa de síntesis de proteína. *b*) Tasas de incorporación de ^{14}C -valina en huevos fertilizados del erizo de mar en presencia o ausencia de actinomicina D, un inhibidor de la síntesis de RNA. El incremento inicial de la síntesis de proteínas que sigue a la fertilización (*a*) no se inhibe por la actinomicina D. Estos resultados indican que la síntesis de proteínas en el periodo subsecuente a la fertilización no depende de plantillas RNAm recién sintetizadas, sino más bien tiene lugar sobre RNAm presente en el huevo en el momento de la fertilización. En contraste, la segunda elevación de la síntesis de proteínas que se inicia casi 10 horas después de la fertilización requiere plantillas nuevas de RNAm porque es inhibida por el fármaco. (*a*: Según D. Epel, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 57:901, 1967; *b*: según P.R. Gross y cols. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 51:409, 1964.)

me el embrión se desarrolla para formar una blástula de unos miles de células. Puesto que el cambio del estado inactivo al activo ocurre con tal rapidez, sería difícil entender de qué manera la síntesis de proteínas después de la fertilización depende de la síntesis acompañante de nuevos RNAm. Como se puede demostrar de varias maneras, el RNA mensajero que se traduce luego de la fertilización está presente en la mayor parte del huevo antes de su contacto con el espermatozoide. Por ejemplo, si los huevos del erizo de mar se fertilizan y crecen en presencia de actinomicina D (potente inhibidor de la síntesis de RNA), después de la fertilización se activa la síntesis de proteínas de manera muy semejante a como ocurre en los cultivos testigo (fig. 12-55, b). Puesto que en presencia del fármaco no pueden producirse nuevos RNA, las proteínas deben sintetizarse sobre plantillas preformadas de RNAm.

Los estudios han descubierto varios mecanismos empleados por las células para regular la tasa de traducción del RNAm en respuesta a las cambiantes necesidades celulares bajo diferentes condiciones ambientales. Se puede considerar que algunos de estos mecanismos actúan *globalmente*, ya que afectan la traducción de todos los mensajes. Por ejemplo, la actividad del factor de inicio F1e2 (pág. 473) disminuye en forma aguda por fosforilación. Cuando una célula es sometida a ciertos estímulos, como la infección viral o el choque por calor, se activa una cinasa particular que fosforila al F1e2, lo que a su vez disminuye la tasa de inicio de la síntesis de nuevos polipéptidos. Otros mecanismos actúan para alterar la tasa de traducción del RNAm específico. Uno de los casos mejor estudiados de este tipo implica al RNAm que codifica la proteína ferritina.

La ferritina es una proteína que funciona para secuestrar átomos de hierro en el citoplasma de las células, protegiendo a la célula contra los efectos tóxicos del metal libre. La traducción de la ferritina de RNAm es regulada por un represor específico cuya actividad depende de la concentración de hierro no enlazado en las células. En ausencia de hierro, el represor se enlaza a una secuencia específica en la RNT 5' del mensaje denominada *elemento de respuesta a hierro (ERH)*, que inhibe su traducción (fig. 12-56). Cuando se encuentra hierro disponible, el represor se convierte a una forma que pierde su afinidad por el elemento de respuesta a hierro. La disociación del represor de la ferritina RNAm permite que el mensaje tenga acceso al mecanismo de traducción y favorece la síntesis subsecuente de la proteína que se enlaza a hierro.

En los últimos 10 años, el RNA se ha reconocido cada vez más como partícula capaz de efectuar funciones específicas distintas de codificar secuencias de aminoácidos. Una de las adiciones más recientes a la creciente lista de actividades del RNA surgió a fines de 1993 en estudios efectuados sobre el nematodo *Caenorhabditis elegans*. *Lin-14* es un gen que codifica una proteína que regula acontecimientos durante el desarrollo temprano de este gusano. Se alcanza un punto durante el desarrollo cuando la síntesis de proteína cesa aunque el *lin-14* de RNAm permanezca en la célula. Se observó que debe haber ciertas secuencias en la RNT 3' del *lin-14* de RNAm si se ha de inhibir la traducción del mensaje. Se supone que la inhibición de la traducción es mediada por una proteína enlazada a la secuencia regula-

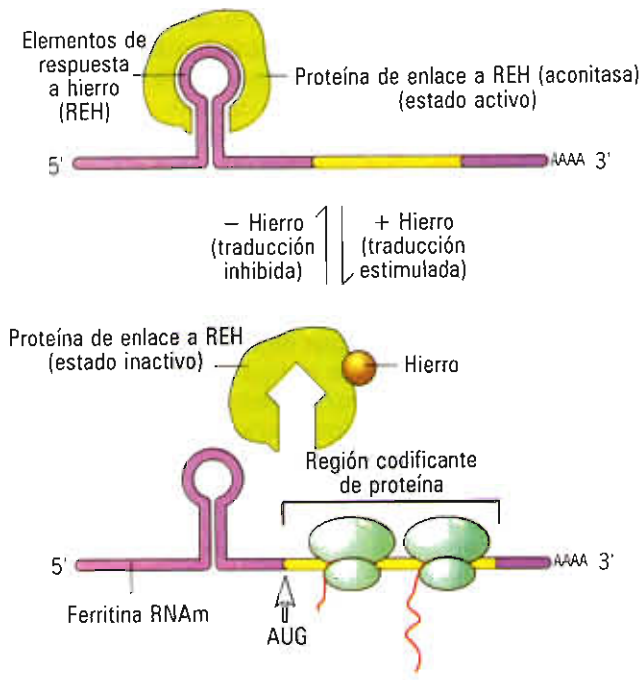


FIGURA 12-56. Control de la traducción de la ferritina RNA. Cuando la concentración de hierro es baja, una proteína enlazada a hierro, denominada aconitasa, se enlaza a una secuencia específica en la región no traducida 5' de la ferritina RNA conocida como elemento de respuesta al hierro (ERH), que se encuentra plegado en forma de gancho para el pelo. Cuando se dispone de hierro, se enlaza al represor, cambiando su conformación y provocando la disociación del ERH, lo que permite la traducción del RNA para formar ferritina.

dora en la RNT 3', pero los estudios indican que el represor no es una proteína, sino una molécula de RNA muy pequeña, producto del gen *lin-4*. La RNT 3' del RNA *lin-14* contiene un tramo de siete secuencias repetitivas homólogas del RNA transcrito a partir del gen *lin-4*. Se ha propuesto que el enlace del pequeño RNA regulador al RNA impide la traducción del mensaje. Es posible que hasta siete RNA *lin-4* puedan enlazarse simultáneamente a las RNT 3' del RNA (fig. 12-57). Tal vez el grado de represión de la traducción sea regulado por el número de RNA *lin-4* enlazado al RNA. Esta hipótesis es apoyada por el dato de que la traducción de los RNA que sólo contienen tres de las secuencias repetidas (formadas a partir de genes en los cuales se han borrado las otras cuatro secuencias) se inhibe a un menor grado que la traducción de los RNA intactos.

El descubrimiento de un RNA que regula la traducción plantea la misma pregunta establecida después del descubrimiento de un RNA capaz de autoempalmado (pág. 478): ¿Es esta una posibilidad rara o la punta de un iceberg? Si los descubrimientos pasados en la bioquímica del RNA son indicadores precisos, sería de esperar que la síntesis de muchas proteínas diferentes se encuentre bajo control de RNA reguladores homólogos a las porciones de las regiones no codificantes del correspondiente RNA.

Control de la estabilidad del RNA

Cuanto más largo sea el RNA presente en una célula, podrá servir en más ocasiones como plantilla para el ensamblado de un polipéptido. Por lo tanto, si una célula tiene que controlar la expresión del gen, es tan importante regular la supervivencia del RNA como regular la síntesis de dicho RNA en primer lugar. A diferencia de los RNA procariotas que inician su descomposición en su extremo 5' incluso antes de concluir su extremo 3', la mayor parte de los RNA eucariotas tienen un periodo de vida relativamente largo. Sin embargo, el periodo de vida de las RNA eucariotas varía mucho. Por ejemplo, el RNA *c-fos* sintetizado en muchas células como respuesta a cambios en las condiciones externas, se descompone con rapidez dentro de la célula (vida media de 10 a 30 minutos). En contraste, el RNA que codifica la producción de proteínas dominantes de una célula, como la hemoglobina en los precursores de eritrocitos o la ovalbúmina en una célula del oviducto de la gallina, típicamente tienen vida media mayor de 24 horas. Igual que con la localización del RNA o la tasa de inicio de la traducción del RNA, la célula puede reconocer RNA específicos y aplicarles tratamiento diferencial.

En un experimento inicial se demostró que los RNA que carecen de apéndices poli(A) se degradan rápidamente luego de inyectarlos dentro de células extrañas, en tanto que los mismos RNA que poseen dichos apéndices fueron relativamente estables. Esta fue la primera demostración para sugerir que la longevidad de un RNA podía relacionarse con la longitud de su apéndice poli(A). Un RNA típico que abandona el núcleo contiene un apéndice poli(A) de casi 200 residuos de adenosina. El apéndice poli(A) no es un RNA desnudo, sino que se encuentra enlazado a una proteína específica, la *proteína de enlace poli(A)* (PEPA). Cada molécula PEPA se enlaza a unos 30 residuos de adenosina. Se cree que la PEPA tiene una función doble. Por un lado, la proteína protege al apéndice contra la actividad nucleasa general, pero por otra parte parece incrementar la sensibilidad del apéndice a una ribonucleasa poli(A) específica.

En la figura 12-58 se muestra un modelo de la vía para la degradación de un RNA. Cuando un RNA permanece en el citoplasma, su apéndice poli(A) tiende a disminuir gradualmente de longitud a medida que es reducido por la nucleasa poli(A) (paso 2, fig. 12-58). No se observa efecto alguno sobre la estabilidad del RNA hasta que el apéndice se reduce unos 30 residuos, que quizá sea una longitud demasiado pequeña para retener una molécula PEPA enlazada (paso 3, fig. 12-58). Una vez que la longitud del apéndice se acorta, el RNA parece desdoblarse con rapidez. Es interesante que la descomposición del RNA comience en el extremo 5' luego de eliminar el poli(A) en el extremo 3' del mensaje. De alguna manera, la presencia del apéndice poli(A) en el extremo 3' del mensaje parece mantener el casquete en el extremo opuesto de la molécula. Una vez eliminado el extremo 3' (paso 4, fig. 12-58), el mensaje pierde su casquete (paso 5) y se descompone a partir del extremo 5' sin casquete hacia el extremo 3' (paso 6).

La longevidad del RNA no depende sólo de la longitud del apéndice poli(A), puesto que diversos RNA con vida media muy diferente empiezan con un apéndice de

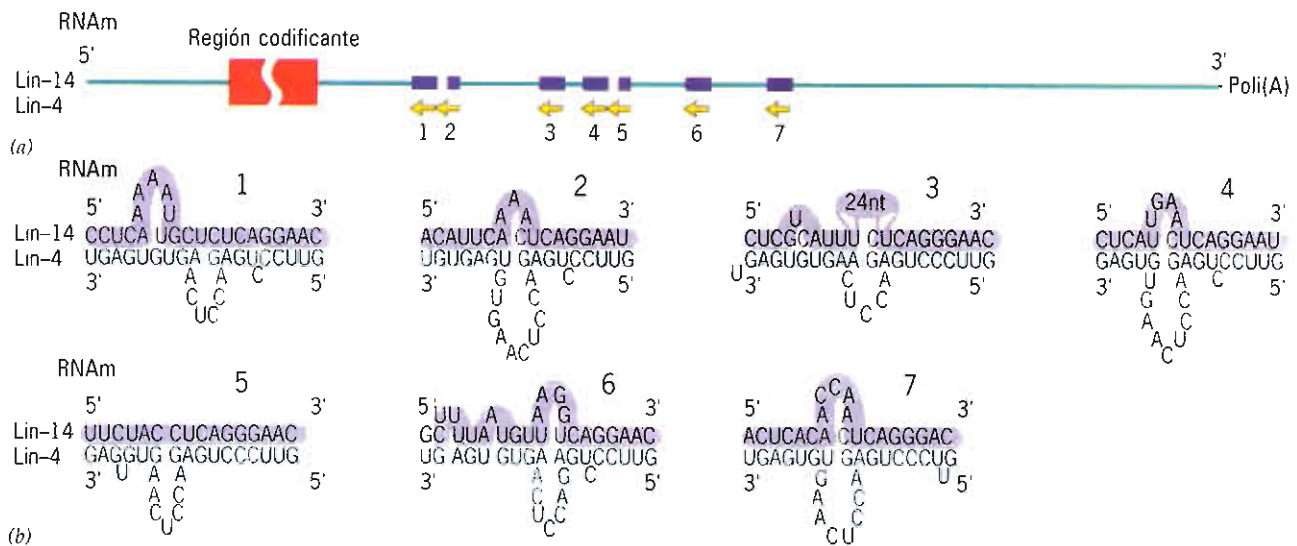


FIGURA 12-57. Control de la traducción mediada por un RNA regulador. a) La RNT 3' del RNAm *lin-14* del nematodo tiene siete regiones distintas capaces de enlazarse al RNA *lin-4*. La región codificante de la proteína por delante de la RNT 3' se indica por los cuadros interrumpidos. b) Esquema hipotético de pares de bases situados entre dos RNA en cada uno de los siete sitios reguladores. (Reimpreso con permiso de M. Wickens y K. Takayama, *Nature* 367:17, 1994; copyright 1994 Macmillan Magazines Limited.)

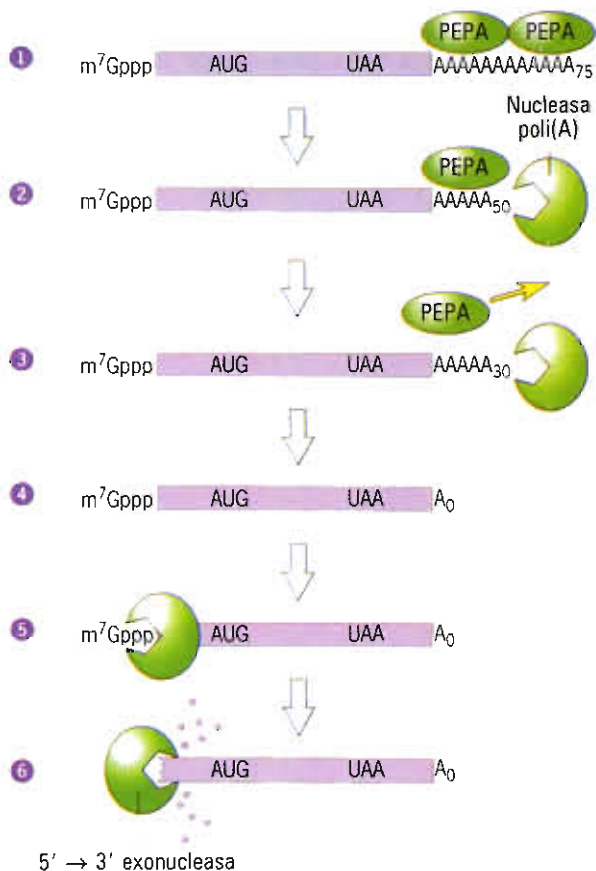


FIGURA 12-58. Degradación del RNAm. Los pasos mostrados en el dibujo se describen en el texto.

longitud similar. Una vez más, las diferencias en la secuencia de nucleótidos de las RNT 3' han demostrado que participan en la tasa de acortamiento causada por el apéndice poli(A). Algunos RNAm contienen secuencias "desestabilizadoras" que al parecer incrementan la susceptibilidad del apéndice poli(A) al ataque de la nucleasa poli(A). Además, los RNA mensajeros con vida media especialmente breve parecen estar sujetos al ataque directo de las endonucleasas que reconocen y desdoblan la molécula en secuencias específicas dentro de la región no traducida 3'.

Antes de dejar el tema de los controles a nivel de traducción y el asunto sobre el control de la expresión de genes en general, se puede hacer notar que en los últimos años se ha descubierto un gran número de sorprendentes fenómenos genéticos nuevos. Hasta ahora, estos procesos sólo se han observado en unos cuantos sistemas, y por lo tanto su aplicación general aún es incierta. Entre estos procesos recién descubiertos se encuentran:

- Cambio del marco de traducción, en el cual el ribosoma cambia su marco de lectura en algún punto durante su viaje a lo largo del RNAm desplazándose un nucleótido hacia atrás (−1) o hacia adelante (+1). Los cambios del marco pueden ser por deslizamiento de un RNA de un codón a un tripleto superpuesto, el cual entonces se convierte en el nuevo codón. Puesto que los cambios del marco pueden ocurrir con una eficiencia menor de 100%, se pueden generar dos polipéptidos diferentes del mismo RNAm.
- Pasar por alto la lectura de un codón de terminación, en el cual el ribosoma continúa su viaje después de un codón de terminación.

- Corrección de un RNAm, en cuyo caso los nucleótidos específicos se convierten en otros nucleótidos después de la transcripción del RNA (postranscripción). La corrección del RNA mensajero ocurre sobre todo en las mitocondrias, pero el caso mejor estudiado es la proteína nuclear codificada de mamífero apolipoproteína B, traducida a partir de un RNAm de unos 14 000 nucleótidos de largo. En el intestino, la citidina del residuo 6666 en el RNA se convierte enzimáticamente a uridina, que genera un codón de paro (UAA) que concluye la traducción. La versión acortada de la proteína, denominada apolipoproteína B48, sólo se produce en las células del intestino delgado.
- Pasar por alto la traducción, en la cual el ribosoma “brinca” sobre una secuencia de nucleótidos en un RNAm específico dejando una porción interna del mensaje sin traducir.
- Empalme de proteínas, en el cual un segmento de polipéptido específico se secciona y los dos bordes se unen en forma covalente.

Control después de la traducción: determinante de la estabilidad de las proteínas

Hemos visto que las células poseen mecanismos elaborados para controlar la tasa de síntesis de proteínas. No es sorprendente que las células también posean mecanismos para controlar el tiempo de supervivencia de las proteínas una vez que son totalmente funcionales. Aunque el tema de la estabilidad de las proteínas no cae técnicamente bajo el encabezado de control de la expresión de genes, es una

extensión lógica de dicho tema y por lo tanto aparece en esta parte del texto.

Los mecanismos que controlan el periodo de vida de una proteína no están bien comprendidos. Uno de los factores importantes es el aminoácido específico que reside en el extremo N terminal de la cadena de polipéptidos. Los polipéptidos que terminan en ciertos aminoácidos (metionina, serina, alanina, treonina, valina y glicina) típicamente son especies de vida larga con vida media mayor de 20 horas. Por lo contrario, los polipéptidos que terminan en otros aminoácidos (fenilalanina, leucina, ácido aspártico, lisina y arginina) tienen vida media típicamente menor de cinco minutos de duración. Esta relación se conoce como **regla del extremo N**.

Las células pueden emplear varios mecanismos para señalar a las proteínas que deben ser descompuestas, pero el mejor estudiado requiere una pequeña proteína altamente conservada denominada **ubiquitina**. Diversas enzimas participan en la selección de las proteínas “condenadas” y se unen de manera covalente a una lisina específica en cada molécula de ubiquitina. La mayor parte de las proteínas señaladas contienen algunas moléculas de ubiquitina unidas a diferentes sitios dentro de la proteína blanco. Una vez señalada por la ubiquitina, la proteína se descompone enzimáticamente mediante un complejo especial multiproteínico denominado *proteosoma*. Las micrografías electrónicas sugieren que el proteosoma es un complejo en forma de barril, y estudios bioquímicos indican que la proteólisis ocurre en el centro del barril, lo que al parecer protege a otras partes de la célula contra daño proteolítico inespecífico. Los proteosomas se observan tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células eucariotas.

LA VIA EXPERIMENTAL

Genes que controlan el desarrollo embrionario

La teoría de la evolución de Darwin mediante selección natural se apoya fuertemente en sus observaciones acerca de que los miembros de una población poseen características hereditarias que varían de un individuo a otro. Una de las personas que apoyó con mayor fervor la teoría de Darwin fue William Bateson, quien publicó un tratado en 1894 describiendo las variaciones que existían en las poblaciones naturales de diferentes tipos de organismos.¹ Las observaciones de Bateson respecto de los esqueletos de seres humanos revelaron ejemplos raros donde un tipo de vértebra estaba sustituido por otro tipo. Acuñó el término "homeosis" para describir estas diferencias en las cuales una parte del cuerpo aparentemente estaba cambiada por una estructura que normalmente se localiza en otra parte.

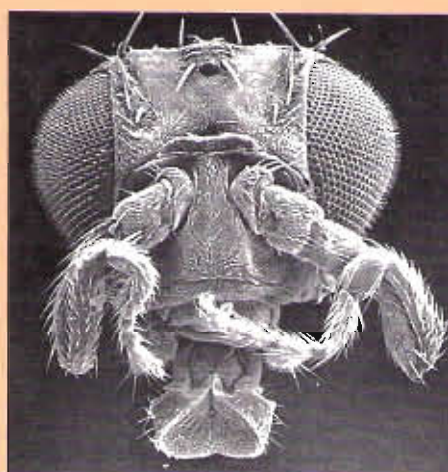
Con el redescubrimiento, en 1900, del trabajo de Mendel sobre plantas de guisantes y los estudios de genética efectuados por Morgan en la mosca de la fruta estableciéndola como un organismo de laboratorio, los biólogos estuvieron en mejor posición para apreciar la importancia de una mutación que podía causar un cambio espectacular en la forma del cuerpo. En 1915, Calvin Bridges, uno de los colegas de Morgan, describió el primer mutante homeótico en la mosca de la fruta. Estudiado en 2 Igual que otros tipos de mosca, la mosca de la fruta de tipo nativo sólo tiene un par de alas localizadas en el segundo segmento torácico. El tercero (último) segmento torácico posee un par de órganos de equilibrio (balancines). En contraste, el tercer segmento torácico del mutante descu-

bierto por Bridges poseía un par de alas pequeñas en vez de los balancines. Bridges denominó al mutante *bitórax* (*bx*). Estudios posteriores indicaron que el *bx* formaba parte de un grupo de genes similares que al parecer controlan la dirección en la cual se desarrollan ambos segmentos, torácico y abdominal. El grupo de genes localizados sobre el tercer cromosoma se conoció como complejo bitórax (BX-C). En 1926 se describió un segundo tipo de mutante homeótico en *Drosophila*, en la cual las antenas normalmente desarrolladas sobre un segmento anterior de la cabeza fueron sustituidas por un par de piernas.³ Este gen se denominó *antennapedia* (*Antp*) y se demostró que era parte de un grupo diferente de genes sobre el tercer cromosoma, denominado complejo antennapedia (ANT-C). En la figura VE 12-1 se muestran gammagrafías electrónicas de una mosca de la fruta normal, de un mutante *bx*, y de un mutante *Antp*.

Gran parte del trabajo de identificar los genes que constituyen los dos complejos homeóticos fue efectuado por Edward B. Lewis, del California Institute of Technology. En una de sus últimas publicaciones, Lewis especuló acerca de que los genes homeóticos pudieron haber evolucionado para satisfacer dos necesidades distintas de una mosca conforme cada una se volvía más diferente de sus ancestros milipédicos.⁴ Una de estas necesidades sería la de suprimir la formación de un par de piernas en aquellos segmentos de la mosca que, a diferencia de la forma ancestral del cuerpo, no formó piernas largas. Una segunda necesidad sería la de suprimir la formación de un



(a)



(b)



(c)

FIGURA VE 12-1. Gammagrafía electrónica de: a) mosca de la fruta normal; b) un mutante *Antp* en el cual las antenas fueron sustituidas por un par de piernas, y c) un mutante *bx* en el cual dos de los tres segmentos torácicos poseen un par de alas. (a,b: Cortesía de F.R. Turner; c: según David Scharf/Peter Arnold.)

segundo par de alas presentes en los insectos ancestros de cuatro alas. Una mutación en el primer grupo de genes causaría que un segmento produjera una pierna (como en el mutante *Antp*), en tanto que una mutación en un gen del segundo cuerpo provocaría el desarrollo de un segundo par de alas (como en *bx*).

El hecho de que los genes que constituyen los complejos *bitórax* y *antenapedia* parecen tener funciones similares para controlar la vía del desarrollo de diferentes segmentos, sugiere que quizá se originaron como resultado de la duplicación y divergencia de un solo gen ancestral. Una manera de probar la relación evolutiva entre los genes es determinar si ellos poseen o no secuencias de DNA homólogas. La primera indicación de que los genes homeóticos verdaderamente comparten una región de secuencia similar provino de estudios efectuados en el laboratorio de Walter Gehring, en la Universidad de Basilea, en Suiza, publicados como una serie de trabajos en 1984. En una de estas publicaciones,⁵ se extrajo DNA de moscas adultas, se digirió con la enzima *EcoRI*, y se sometió a electroforesis a través de gel de agarosa para separar los fragmentos resultantes según su tamaño. Los fragmentos de DNA en el gel fueron desnaturalizados sumergiendo el gel en una solución de NaOH y luego se transfirió sobre una lámina de filtro de nitrocelulosa presionando el gel contra la nitrocelulosa. Esta técnica, denominada mancha de Southern, por Edward Southern quien la desarrolló, causa que los fragmentos de DNA se absorban al filtro de nitrocelulosa como resultado de la acción capilar (fig. 17-12). Una vez que los fragmentos se fijan sobre el filtro se pueden incubar en soluciones que contienen sondas de DNA de una sola cadena marcadas con isótopo radiactivo, las cuales se unen (hibridizan) a los fragmentos de DNA complementarios sobre el filtro. El DNA marcado no enlazado se puede lavar y probar la localización de las sondas unidas mediante autorradiografía presionando el papel filtro contra una película de rayos X.

En estos experimentos, las sondas marcadas se prepararon a partir de fragmentos cortos del complejo BX-C o del ANT-C previamente clonados. Utilizando la mancha de Southern preparada del DNA total según se describió antes, se observó que algunas de las sondas marcadas eran capaces de hibridar varios fragmentos de diferente tamaño sobre el filtro de nitrocelulosa. Así se demostró en estos experimentos que el DNA del genoma contiene algunos sitios diferentes complementarios de una sola sonda marcada representando una pequeña parte del complejo ANT-C o BX-C.

El siguiente paso fue explorar la capacidad de esta misma sonda marcada para enlazarse a fragmentos de restricción preparados a partir de genes específicos. Utilizando esta técnica se encontró que cada uno de los tres genes diferentes de los complejos homeóticos [*antenapedia*, *ultrabithorax* (*Ubx*), y *fushi tarazu* (*ftz*)] contiene una secuencia capaz de hibridar al fragmento marcado, lo que indica que los tres genes comparten una región que posee una secuencia similar de nucleótidos. Esta región similar se denomina *homeobox*.⁵

La *homeobox* no es parte de una región reguladora del DNA, sino que reside dentro de la porción codificante de los genes. El análisis subsecuente de las regiones de los tres genes homeóticos que se enlazaron a la misma sonda indicó que la

región de homología está limitada a un tramo de 180 pares de bases que codifican un tramo de 60 aminoácidos denominado el *homeodominio*. El análisis de la secuencia de la región *homeobox* en los tres genes indicó que *Antp* muestra 77% de homología con *ftz* (o sea, 138 nucleótidos de los 180 coincidieron perfectamente). La homología de los genes *ftz* y *Ubx* fue de 75%, en tanto que la de *Antp* y *Ubx* fue de 79%. Más aún, muchas de las sustituciones de nucleótidos que distinguen los tres genes consistieron en una simple sustitución de un aminoácido sobre un codón que simplemente reemplazó a otro codón que especifica el mismo aminoácido. De los 60 aminoácidos codificados por la *homeobox*, 45 de ellos son idénticos en los tres genes.⁶

También se consideró el papel de la proteína codificada por estos genes. El hecho de que el *homeodominio* sea rico en aminoácidos básicos (aproximadamente 19 de los 60 aminoácidos fueron lisina, arginina o histidina) plantea la posibilidad de que la proteína funciona enlazándose a DNA. Aunque la secuencia de aminoácidos del *homeodominio* no muestra homología extensa con la de cualquier otra proteína conocida, mostró una débil homología con un par de proteínas de levaduras que se sabe funcionan como factores de transcripción que se enlazan a DNA. Por lo tanto, según la naturaleza básica del *homeodominio* y de la débil homología a proteína que se enlaza a DNA, se propuso que los genes homeóticos podían codificar proteínas que actúan como factores de transcripción que se enlazan a DNA. Esta hipótesis coincide con la idea de que los genes homeóticos actúan como genes "maestros para control" cuyos productos controlan la expresión de varios genes subordinados.

Una vez establecido que la secuencia *homeobox* es una característica consistente de los genes homeóticos de *Drosophila*, se plantea la pregunta de la presencia de una secuencia similar en los genes de otros organismos. Para someter a prueba esta posibilidad, William McGinnis y sus colaboradores, en el laboratorio de Gehring, prepararon la mancha de Southern utilizando DNA genómico total fragmentado procedente de varios organismos y probaron la capacidad de los fragmentos separados para enlazarse a sondas DNA marcadas que contienen la secuencia *homeobox* de *Drosophila*.⁶ Cuando el DNA probado con la mancha de Southern fue aislado de *Drosophila* aparecieron marcas sobre seis bandas de las manchas de la nitrocelulosa (tres correspondieron a *ftz*, *Ubx* y *Antp*, y tres a otros genes). El DNA procedente de escarabajos, lombriz de tierra, pollos, ratones y del hombre también produjo algunas bandas marcadas, lo que indica la presencia en cada uno de estos organismos de varios genes que contienen la secuencia *homeobox*. En estos primeros estudios se observó que alrededor de seis a ocho fragmentos de restricción del DNA del ratón y del hombre se unen al *homeobox* de *Drosophila* que contiene la sonda DNA. En contraste, el DNA de bacterias no mostró la presencia de secuencias *homeobox*. No sólo los genes de ratones y del hombre poseen un *homeobox*, pronto se demostró que la secuencia se conserva notablemente entre moscas y mamíferos, miembros de dos filum notablemente divergentes. Por ejemplo, se demostró que uno de los fragmentos de restricción del genoma de ratón codifica un polipéptido en el cual 44 de los 60 aminoácidos del *homeobox* fueron idénticos con los

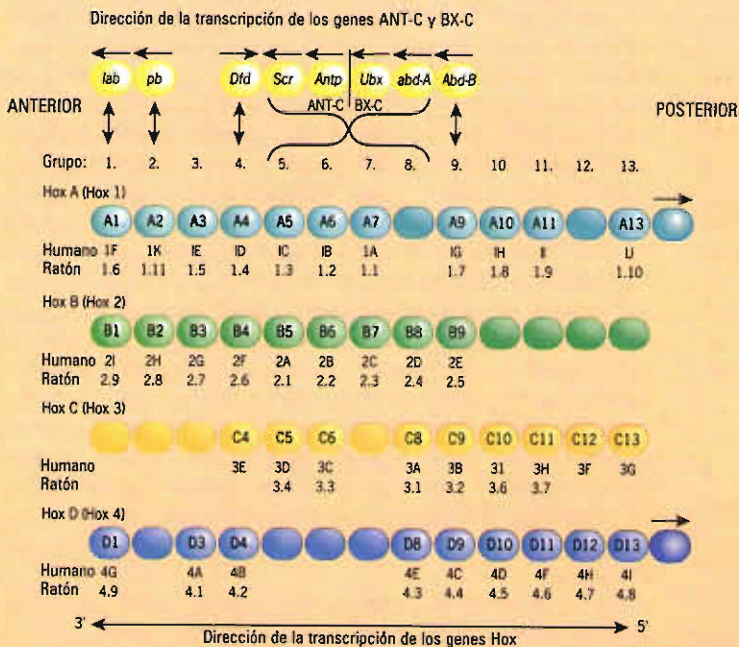


FIGURA VE 12-3. Organización de los genes que constituyen los cuatro complejos *Hox* de mamífero. Los genes se denominan según la nomenclatura propuesta en el trabajo publicado en 1992. En la parte de arriba se muestra la alineación con los genes *Drosophila*. La dirección de la transcripción de los genes está indicada por flechas de una sola punta. (Según M.P. Scott, Cell 71:551, 1992; con permiso de Cell Press.)

ron poco después de nacer como resultado de anomalías mayores localizadas principalmente en cuello y garganta.¹³ Estos defectos del desarrollo incluyeron ausencia del timo y de las glándulas paratiroides, reducción de los tejidos en las glándulas tiroidea y salivales submaxilares, y también anomalías craneofaciales y defectos en el corazón y las arterias principales. Las deficiencias anatómicas que ocurren en estos ratones son notablemente semejantes a una rara enfermedad congénita humana denominada síndrome de DiGeorge, lo que plantea la posibilidad de que este padecimiento humano sea resultado de la expresión anormal de este gen homeótico.

Los productos de los genes *Hox* son proteínas que se unen a DNA y se cree que actúan como factores de transcripción para regular la expresión de otros genes que participan en el desarrollo de las estructuras embrionarias. Los primeros estudios de la actividad del homeodominio que se enlaza a DNA fueron efectuados utilizando proteína codificada por el gen *dentado*, uno de los genes incluidos en el homeobox de la mosca de la fruta.¹⁴ Para definir mejor la actividad de enlace al DNA de la proteína, se realizó un estudio en el cual varias partes de la secuencia codificada por el gen *dentado* se fusionaron con el gen bacteriano β -galactosidasa. A continuación se sintetizaron estas proteínas de fusión (quiméricas) y se les permitió enlazarse a fragmentos de DNA procedentes del genoma. La capacidad de la proteína de fusión para enlazarse al DNA se determinó mediante precipitación de complejos proteína-DNA con un anticuerpo contra β -galactosidasa.

Mediante este procedimiento se determinó que la mayor parte de la proteína procedente del gen *dentado* carecía de actividad para enlazarse a DNA y por lo tanto estaba dispensada de esta función. La actividad para enlazarse al DNA de la proteína *dentada* se localizó en una región que consta de casi todo el homeodominio y también de 12 aminoácidos adicionales

en un flanco de su extremo N terminal. La secuencia DNA implicada en el enlace del homeodominio se determinó permitiendo el engrane de la proteína dentada de fusión con fragmentos DNA genómicos, y a continuación tratando los complejos proteína-DNA con una enzima (DNasa I) que digiere todo el DNA no protegido por una proteína enlazada. En seguida se quitó la enzima y el DNA no digerido se purificó y secuenció. Este tipo de experimentos suministra una "huella" de la secuencia de DNA enlazado por la proteína.

Los resultados de estos experimentos indican que la proteína dentada se une a fragmentos de DNA que tienen una secuencia igual o muy similar a TCAATTAAAT. En la mayor parte de los casos, esta secuencia se repite varias veces dentro de la región protegida del DNA. La identificación de una secuencia de DNA a la cual se puede unir el homeodominio proporcionó la herramienta para buscar dichos sitios en las regiones reguladoras situadas hacia adelante de los genes que se sabe participan en el desarrollo embrionario. La identificación de un sitio reconocible en el homeodominio también permitió describir la estructura tridimensional del complejo formado por el homeodominio y el DNA al cual se enlaza.¹⁵ Se demostró que el homeodominio contiene un motivo de enlace a DNA denominado hélice-vuelta-hélice (HVN) similar al que se identificó previamente en represores bacterianos que se enlazan a sitios operadores en los operones bacterianos (pág. 510). Los aspectos claves de la interacción entre el DNA y el producto de un gen homeótico se muestran en la figura VE 12-4.

Una de las cuestiones más importantes respecto de la actividad de los genes homeóticos es de qué manera se distingue el producto de un gen de los productos de otros genes. Como se hizo notar antes, las secuencias de aminoácidos de los homeodominios de diferentes proteínas homeóticas son muy



FIGURA VE 12-4. Diagrama que muestra la relación del brazo N terminal del homeodominio y la doble hélice DNA. La posición de las hélices α se indica por los cilindros. (Según C.R. Kissinger y cols. *Cell* 63:581, 1990; con permiso de Cell Press.)

similares entre sí. Como resultado, inicialmente sería de esperar que las diferencias en actividad de enlace a DNA de diferentes productos de genes homeóticos pudieran ser determinadas por aquellas partes de la proteína que residen fuera del homeodominio; estas son las regiones de las proteínas muy diferentes entre sí. Una manera de determinar que parte de un grupo de proteínas relacionadas determina su especificidad funcional es construir genes que codifiquen proteínas híbridas que contengan porciones de varios miembros del grupo.

A continuación se pueden introducir estos genes híbridos en la mosca de la fruta o en un embrión de ratón y observar su efecto sobre el desarrollo. En varios laboratorios se han efectuado experimentos en los cuales partes de proteínas homeóticas se intercambian entre sí, y todos los resultados indican que la especificidad funcional se encuentra en la secuencia de aminoácidos del propio homeodominio. Por lo tanto, si un gen híbrido codifica una proteína cuyo homeodominio pertenezca a la proteína A y el resto a la proteína B, la proteína híbrida funciona como si fuera proteína A.^{16,17}

Los resultados de estos experimentos plantean preguntas importantes respecto de la manera en que las proteínas con dominios similares de enlace a DNA, que en algunos casos sólo difieren por unos pocos aminoácidos, se encargan de activar diferentes baterías de genes causantes del desarrollo de partes del embrión en distintos tipos de estructuras. Se supone que los productos de los genes homeóticos actúan como parte de una red de factores de transcripción que compiten entre sí por tipos similares de sitios de enlace en las regiones reguladoras de los genes importantes desde el punto de vista del desarrollo. Por último, las señales para que un segmento particular de una mosca se desarrolle para formar una antena en vez de una pierna quizá dependa de diferencias relativamente sutiles en la afinidad de los factores de transcripción homeóticos para secuencias particulares de DNA.

La importancia de los factores de transcripción en el inicio de la formación de un órgano particular es más evidente en estudios recientes realizados sobre un gen que controla el de-

sarrollo del ojo. El ojo de un insecto es un órgano complejo que requiere la actividad combinada de unos 2 500 diferentes productos de genes. *Drosophila eyeless (ey)* es una mutante que no desarrolla sus ojos, lo que indica que el producto del gen *ey* participa en la formación del ojo. Sin embargo, la importancia de la proteína no se comprobó sino hasta 1995, cuando Gehring y sus colaboradores demostraron que el producto del gen *ey* es capaz por sí solo de provocar el desarrollo de un ojo en cualquiera de las partes más improbables del cuerpo de la mosca, como un ala o una pierna (fig. VE 12-5).¹⁸

Para efectuar este experimento, los investigadores prepararon dos grupos de moscas de la fruta manipulados genéticamente. Un grupo era portador de copias extra del gen *eyeless* localizado hacia atrás de una región reguladora que podía ser activada por un factor de transcripción de levadura llamado GAL4. El segundo grupo portaba copias del gen de levadura GAL4 cuya expresión estaba controlada por el amplificador más cercano (pág. 517) que respondía a factores de transcripción específicos del tejido. Por consiguiente, el gen GAL4 sólo se expresó en tejidos específicos de estos animales. Cuando se aparearon los miembros de estos dos grupos de moscas, la descendencia contenía elementos construidos por ambos tipos de genes extraños, y en consecuencia expresó el gen *ey* en las células que producían GAL4. Cuando GAL4 se expresó en



FIGURA VE 12-5. La pierna de esta mosca de la fruta posee un ojo completamente formado como resultado de la expresión forzada del gen *eyeless* dentro de las células del primordio de la pierna durante el desarrollo del adulto. (Cortesía de U. Kloter, G. Halder y W.J. Gehring.)

células de las alas, ocurrió lo mismo con el producto del gen *ey*, lo que provocó que las células de las alas dieran lugar a un ojo. Algunos miembros de la descendencia de este apareamiento produjeron hasta 14 ojos diferentes localizados en varios sitios anormales (o sea *ectópicos*) alrededor del cuerpo. Además de proporcionar el encabezado para los periódicos alrededor del mundo, esta investigación sugirió que *ey* era un verdadero gen maestro para el control de la formación del ojo. Al parecer, el producto del gen puede activar otros genes que inician una reacción en cadena que conduce a la construcción ordenada de todas las partes de un ojo.

Puesto que los ojos de los artrópodos y de los vertebrados se construyen de manera tan diferente, siempre se asume que los dos tipos de ojos evolucionaron de manera independiente. Aun así, dos experimentos demuestran que los mamíferos, incluyendo ratones y el hombre, contienen un gen homólogo a *eyeless*, el cual se ha demostrado que participa en la formación del ojo. En realidad, el gen del mamífero puede sustituir al gen de la mosca para provocar la formación de ojos ectópicos en la mosca de la fruta. Por lo tanto, aunque las moscas y los mamíferos desarrollan tipos muy diferentes de ojos, los datos sugieren que el desarrollo del ojo está controlado por un tipo similar de "gen maestro" y que los dos tipos de ojos en realidad están evolutivamente relacionados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bateson, W. 1894. *Materials for the Study of Variation Treated with Especial Regard to Discontinuity in the Origin of Species*. Macmillan.
2. Bridges, C.B. y Morgan, T.H. 1923. The Third-Chromosome Group of Mutant Characters of *Drosophila melanogaster*. *Carnegie Inst. of Washington Publ.* 327:93.
3. Balkaschina, E.I. 1926. *Wilh. Roux Arch. Entwickl. Org.* 127:575-590.
4. Lewis, E.B. 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276:565-570.
5. McGinnis, W. y cols. 1984. A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila* Antennapedia and bithorax complexes. *Nature* 308:428-433.
6. McGinnis, W. y cols. 1984. A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37:403-408.
7. McGinnis, W. y cols. 1984. Molecular cloning and chromosome mapping of a mouse DNA sequence homologous to homeotic genes of *Drosophila*. *Cell* 38:675-680.
8. Duboule, D. y Dolle, P. 1989. The structure and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *EMBO J.* 8:1497-1505.
9. Scott, M.P. 1992. Vertebrate homeobox gene nomenclature. *Cell* 71:551-553.
10. Awgulewitsch, A. y cols. 1986. Spatial restriction in expression of a mouse homeobox locus within the central nervous system. *Nature* 320:328-335.
11. Graham, A., Papalopolu, N. y Krumlauf, R. 1989. The murine and *Drosophila* homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* 57:367-378.
12. Wilkinson, D.G. y cols. 1989. Segmental expression of *Hox-2* homeobox-containing genes in the developing hindbrain. *Nature* 341:405-409.
13. Chisaka, O. y Capecchi, M.R. 1991. Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *hox-1.5*. *Nature* 350:473-479.
14. Desplan, C., Theis, J. y O'Farrell, P.H. 1988. The sequence specificities of homeodomain-DNA interactions. *Cell* 54:1081-1090.
15. Kissinger, C.R. y cols. 1990. Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: A framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 63:579-590.
16. Lin, L. y McGinnis, W. 1992. Mapping functional specificity in the *Dfd* and *Ubx* homeodomains. *Genes Dev.* 6:1071-1081.
17. Furukubo-Tokunaga, K., Flister, S. y Gehring, W.J. 1993. Functional specificity of the Antennapedia homeodomain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6360-6365.
18. Halder, G., Callaerts, P. y Gehring, W.J. 1995. Induction of ectopic eyes by targeted expression of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Science* 267:1788-1792.

SINOPSIS

El núcleo de una célula eucariota es una compleja estructura rodeada por una envoltura nuclear que controla el intercambio de materiales entre el núcleo y el citoplasma, y mantiene la composición única de cada uno de los principales compartimientos de células. La envoltura nuclear consta de varios elementos distintos, incluyendo una membrana nuclear interna y otra externa separadas por un espacio perinuclear y un número variable de poros nucleares. Los poros nucleares son sitios donde las membranas nucleares interna y externa se fusionan para formar una abertura circular llena por una estructura compleja denominada complejo del poro nuclear (CPN). El CPN tiene una estructura semejante a una canastilla con simetría octagonal compuesta de anillos, radios, partículas y filamentos. Los poros de entrada son sitios a través de los

cuales circulan materiales entre el núcleo y el citoplasma. Los estudios indican que las sustancias de bajo peso molecular pueden difundir a través del CPN, tal vez pasando entre los radios. RNA y proteínas se desplazan a través del CPN en ambas direcciones mediante un proceso aún poco comprendido de transporte selectivo. Las proteínas que normalmente residen dentro del núcleo contienen un tramo de aminoácidos denominado señal de localización nuclear (SLN) que les permite enlazarse a un receptor en la superficie citoplásmica del CPN, y que al parecer desencadena un cambio de conformación en el transportador central permitiendo que las moléculas enlazadas penetren al interior del núcleo. La superficie interna de la envoltura nuclear se encuentra revestida por una red fibrilar denominada lámina nuclear, que consta de proteínas

(láminas) que son miembros de la familia de las proteínas que constituyen filamentos intermedios. El líquido del núcleo se denomina nucleoplasma (p. 489).

Los cromosomas del núcleo contienen un complejo definido de DNA y proteínas histona que forman filamentos nucleoproteínicos característicos representando el primer paso en el empaquetamiento del material genético. Las histonas son proteínas pequeñas básicas divididas en cinco tipos distintos. Las histonas y el DNA se organizan en complejos nucleosómicos centrales, que constan de dos moléculas de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 rodeadas por casi dos vueltas de DNA. Las partículas centrales del nucleosoma están conectadas entre sí por tramos de DNA de unión que en promedio constan de casi 60 pares de bases. En conjunto, las partículas centrales y el DNA de unión generan un filamento nucleosómico que recuerda las cuentas de un rosario. Las histonas del complejo central están organizadas con las porciones hidrofóbicas de las proteínas dirigidas hacia el centro del complejo y sus porciones básicas extendidas hacia afuera para formar uniones iónicas con los residuos fosfato del esqueleto de DNA. La interacción entre histonas y DNA es sobre todo estructural y relativamente independiente de la secuencia de nucleótidos, aunque se conocen excepciones importantes donde los nucleosomas se colocan en sitios específicos sobre el DNA. El empaquetamiento del DNA dentro de los nucleosomas reduce su longitud más o menos a una séptima parte en relación con su condición cuando se encuentra completamente extendido (p. 492).

La cromatina dentro de las células no se encuentra en forma de filamento ampliamente extendido, sino está compactada en niveles más altos de organización. Cada partícula central nucleosómica contiene una molécula de histona H1 que se une al DNA conforme la partícula entra y sale. Las histonas H1 median una interacción entre nucleosomas vecinos que generan un filamento de 30 nm, que representa un nivel más elevado de organización de la cromatina. Los filamentos de 30 nm se organizan a su vez en dominios en forma de asa que se pueden visualizar con mayor facilidad cuando los cromosomas mitóticos son sometidos a procedimientos para retirar histonas. Los cromosomas mitóticos representan el estado más compacto de la cromatina, estado en el cual las asas que componen un cromosoma simple se juntan en una estructura altamente compacta. Cierta fracción de la cromatina, denominada heterocromatina, permanece en este estado altamente compacto a través de la interfase. La heterocromatina se divide en cromatina constitutiva, que permanece condensada en todas las células en todo momento, y heterocromatina facultativa, que se inactiva específicamente durante ciertas fases de la vida de un organismo. Uno de los cromosomas X de cada célula de los mamíferos hembra se encuentra sujeto a un proceso de inactivación durante el desarrollo embrionario que lo convierte en heterocromatina facultativa inactiva a nivel de transcripción. Puesto que la inactivación X ocurre al azar, en la mitad de las células del embrión se inactiva el cromosoma X derivado del padre, en tanto que el cromosoma X derivado de la madre se inactiva en la otra mitad. Como resultado, las hembras adultas son mosaicos genéticos con respecto de los genes presentes en el cromosoma X (p. 497).

Los cromosomas mitóticos poseen varias características fácilmente reconocibles. Los cromosomas mitóticos pueden prepararse mediante la lisis de células detenidas en mitosis y luego teñidas por diferentes procedimientos para generar cromosomas identificables que contengan patrones predecibles de bandas. Cada cromosoma mitótico contiene una indentación marcada, denominada centrómero, que aloja secuencias DNA altamente repetidas y sirve como sitio para unir microtúbulos durante la mitosis. Los extremos del cromosoma son los telómeros, que contienen una cadena rica en G que corre más allá de su complemento rico en C. Una enzima especial, llamada telomerasa, que contiene RNA como elemento integral, mantiene esta disposición de una generación de células a la siguiente. Los telómeros al parecer desempeñan varios papeles importantes en la regulación de la actividad celular (p. 500).

El núcleo es un compartimiento celular altamente ordenado. Esto se comprueba con la observación de que cromosomas específicos están confinados a regiones particulares del núcleo; los telómeros pueden relacionarse con la envoltura nuclear; las RNP implicadas en el empalmado de los pre-RNAm se restringen a sitios particulares, y los movimientos de los transcritos recién sintetizados están restringidos al momento en que se procesan. Las pruebas indican que la red de filamentos proteínicos que constituye la matriz nuclear desempeña un papel clave en el mantenimiento de la estructura ordenada del núcleo (p. 506).

En los procariotes, los genes se organizan en unidades reguladoras llamadas operones. Los operones son grupos de genes estructurales que típicamente codifican diferentes enzimas en la misma vía metabólica. Puesto que todos los genes estructurales se transcriben a un solo RNAm, se puede regular su expresión de manera coordinada. El nivel de expresión de genes está controlada por un compuesto metabólico clave, como el inductor de lactosa, que se fija a una proteína represora y cambia su forma. Este acontecimiento altera la capacidad del represor para enlazarse al sitio operador sobre el DNA y por lo tanto impide la transcripción (p. 508).

Todas las células diferenciadas de un organismo eucariota retienen toda la información genética. La tasa de síntesis de un polipéptido particular es determinada por una serie compleja de acontecimientos reguladores que operan principalmente a tres niveles distintos. 1) Los mecanismos a nivel de la transcripción determinan si un gen será o no transcrito o, en caso afirmativo, con qué frecuencia; 2) los mecanismos de control a nivel de procesamiento determinan la vía mediante la cual se procesa el transcrito de RNA primario, y 3) los mecanismos de control a nivel de traducción determinan si un RNAm particular es realmente traducido y, si es así, con qué frecuencia y durante cuánto tiempo. En algunos casos raros ocurre amplificación selectiva de genes y reordenamiento programado del DNA (p. 511).

En diferentes etapas del desarrollo, células de diferentes tejidos sometidas a diversos estímulos expresan genes diferentes. La transcripción de un gen particular está controlada

por factores de transcripción que son proteínas capaces de enlazarse a secuencias específicas localizadas en sitios fuera de la región codificante del gen. La secuencia reguladora más próxima hacia adelante es el cuadro TATA, que es el principal componente del promotor del gen y sitio de ensamblado del complejo precursor de inicio. Se cree que la actividad de las proteínas en el cuadro TATA depende de interacciones con otras proteínas enlazadas a otros sitios, incluyendo diferentes tipos de elementos de respuesta y elementos amplificadores. Los elementos amplificadores se distinguen por el hecho de que pueden desplazarse de un sitio a otro dentro del DNA, incluso siguiendo dirección inversa. Algunos amplificadores se localizan a veces a 10 000 pares de bases por delante del gen cuya transcripción estimulan. Se cree que las proteínas enlazadas a un amplificador y a un promotor entran en contacto gracias a la acción de las asas formadas en el DNA (p. 516).

La determinación de la estructura tridimensional de algunos complejos formados entre factores de transcripción y DNA indica que estas proteínas se enlazan al DNA mediante un número limitado de motivos estructurales. En condiciones típicas, los factores de transcripción contienen cuando menos dos dominios, uno cuya función es reconocer y enlazarse a una secuencia específica de pares de bases en el DNA, y otro cuya función es activar la transcripción al interactuar con otras proteínas. La mayor parte de los factores de transcripción se enlazan al DNA en forma de dímeros, sean heterodímeros u homodímeros, que reconocen secuencias en el DNA que poseen simetría doble. Casi todos los motivos que se enlazan al DNA contienen un segmento, a menudo una hélice α , dentro del surco mayor del DNA, donde reconocen la secuencia de pares de bases que revisten dicho surco. Entre los motivos más comunes presentes en las proteínas que se enlazan a DNA se encuentra el dedo de zinc, la hélice-asa-hélice, y el cuadro GME. Cada uno de estos motivos proporciona un armazón estructuralmente estable sobre el cual la superficie de la proteína que reconoce específicamente el DNA puede interactuar con la doble hélice de DNA. Aunque tal vez la mayor parte de los factores de transcripción sean estimuladores, algunos actúan inhibiendo la transcripción (p. 518).

Se piensa que la metilación de las bases citosina de ciertos nucleótidos residentes en regiones ricas en G-C inactivan funcionalmente a los genes eucariotas. La metilación es una modificación dinámica; existen enzimas para eliminar grupos metilo y también para añadirlos. La adición de grupos metilo en regiones reguladoras clave por delante de los genes se correlaciona con disminución de la transcripción del gen, en tanto que la eliminación de dichos grupos metilo se correlaciona con un incremento de la transcripción. El efecto de la metilación es particularmente evidente en la cromatina que ha sido inactivada a nivel de transcripción mediante heterocromatización, como el cromosoma X inactivo de la célula de los mamíferos hembra. Otro fenómeno relacionado con la metilación del DNA es la impresión genómica, que afecta a un pequeño número de genes del embrión activos o inactivos

a nivel de transcripción según el progenitor del cual se originen (p. 522).

La incorporación de DNA a los nucleosomas añade otra dimensión al control de la transcripción generando oportunidades para el control de dicha transcripción. El acomodo preciso del nucleosoma en la región reguladora de un gen desempeña un papel importante al permitir que las proteínas que se unen a DNA estimulen la transcripción de dicho gen. La interacción de un factor de transcripción con el DNA puede inducir cambios secundarios en la estructura de la cromatina permitiendo que otros sitios sean más o menos accesibles al enlace subsecuente de proteínas. Además, la cromatina activa a nivel de transcripción posee ciertas propiedades distintivas que la distinguen de la cromatina inactiva, sobre todo de sitios hipersensibles a la digestión enzimática del DNA. Ciertas pruebas indican que los nucleosomas sufren modificaciones que hacen más accesible el DNA a las moléculas de polimerasa conforme se transcribe el DNA empaquetado (p. 525).

La expresión de genes es regulada a nivel de procesamiento por el empalme alternativo, proceso mediante el cual un solo gen puede codificar dos o más proteínas relacionadas. Se pueden procesar muchos transcritos primarios a través de más de una vía, produciendo RNAm que contiene diferentes combinaciones de exones. En el caso más simple, un intrón específico puede ser empalmado fuera del transcrito o retenido como parte del RNAm final. Se piensa que la vía específica seguida durante el procesamiento de precursores de RNAm depende de la presencia de proteínas que controlan los sitios de empalme reconocidos por desdoblamiento (p. 528).

La expresión de genes es regulada a nivel de traducción por diferentes procesos, incluyendo localización del RNAm, control de la traducción de los RNAm existentes y longevidad del RNAm. Casi todas estas actividades reguladoras son mediadas por interacciones con las regiones no traducidas 5' y 3' (RNT) del RNAm. Por ejemplo, se piensa que la localización del RNAm en regiones particulares de los huevos de la mosca de la fruta es mediada por proteínas que reconocen secuencias de localización en la RNT 3'. La presencia de un RNAm en el citoplasma no garantiza su traducción. El mecanismo sintetizador de proteínas de una célula puede estar controlado globalmente de modo que se pueda afectar la traducción de todos los RNAm, o la traducción de RNAm específicos, como ocurre en el control de la síntesis de ferritina por la concentración de hierro que actúa por medio de proteínas que se enlazan a la RNT 5' de la ferritina de RNAm. Uno de los factores primarios que controlan la longevidad (estabilidad) del RNAm es la longitud del apéndice poli(A). Esta parte del RNAm normalmente se encuentra protegida por una proteína unida a poli(A). Nucleasas específicas dentro de la célula gradualmente acortan el apéndice poli(A) hasta alcanzar un punto donde la proteína protectora ya no puede ser retenida por el apéndice. Una vez perdida la proteína, el RNAm queda sin su casquete y su descomposición ocurre en la dirección 5' a 3' (p. 529).

PREGUNTAS DE REPASO

1. Describir los elementos que constituyen la envoltura nuclear. ¿Cuál es la relación entre las membranas nucleares y el complejo del poro nuclear? ¿De qué manera regula el complejo del poro nuclear el movimiento de materiales en ambas direcciones entre el núcleo y el citoplasma?
2. ¿Cuál es la relación entre las histonas y el DNA de una partícula central del nucleosoma? ¿Cómo se reveló por primera vez la existencia de los nucleosomas? ¿Cómo se organizan los nucleosomas en niveles más altos de organización de cromatina? ¿Cuál es el papel de la histona H1 en esta jerarquía?
3. ¿Cuál es la diferencia estructural y funcional entre heterocromatina y eucromatina? ¿Entre heterocromatina constitutiva y heterocromatina facultativa? ¿Entre un cromosoma X activo y uno inactivo en las células de mamíferos hembra?
4. ¿Cuál es la diferencia estructural y funcional entre los centrómeros y los telómeros de un cromosoma?
5. Describir algunas observaciones que sugieran que el núcleo es un compartimiento ordenado y que la matriz nuclear participa en mantener dicho orden.
6. Describir la cascada de sucesos que causan cambios súbitos en la expresión del gen en una célula bacteriana luego de la adición de lactosa. ¿Cómo se puede comparar esto con lo que ocurre en respuesta a la adición de triptófano?
7. ¿Cuál es el papel del AMP cíclico en la síntesis de β -galactosidasa?
8. Describir los diferentes niveles de regulación de la expresión del gen que permiten que el gen de la globina β , con la siguiente estructura, dirija la formación de una proteína que explica casi 95% de toda la proteína de la célula.

exón 1-intrón-exón 2-intrón-exón 3
9. ¿Cuáles son las funciones de un represor *lac* bacteriano y de un receptor similar de glucocorticoides en mamíferos? ¿En qué son diferentes?
10. Describir un ejemplo en el cual la diferenciación celular se acompaña de cambios selectivos en la estructura del genoma
11. ¿Qué tipo de secuencias reguladoras se encuentran en las regiones reguladoras del DNA por delante de un gen, como el que codifica la metalotioneína? ¿Cuál es el papel de estas diferentes secuencias para controlar la expresión de los genes cercanos?
12. ¿De qué manera la posición del nucleosoma puede estimular o inhibir la transcripción de los genes cercanos?
13. Describir un ejemplo de empalme alternativo. ¿Cuál es el valor del control de este tipo para una célula? ¿Cómo puede regular una célula los sitios donde se elige el ensamblado de precursores de RNAm?
14. Describir tres diferentes maneras para controlar la expresión de genes a nivel de traducción. Citar un ejemplo de cada uno de estos mecanismos de control.
15. ¿Cuál es el papel del apéndice poli(A) en la estabilidad del RNAm? ¿Cómo puede la célula regular la estabilidad de los diferentes RNAm?

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. ¿Qué consecuencias podrían esperarse como resultado de las mutaciones en diferentes proteínas que constituyen la matriz nuclear?
2. Luego de examinar las micrografías electrónicas de las figuras 12-4 y 12-8, ¿qué se puede concluir respecto de la magnitud de los materiales capaces de atravesar los poros nucleares? ¿Cómo concuerda esto con la observación de que proteínas relativamente pequeñas, como la albúmina, no penetran al núcleo cuando se inyectan en el citoplasma?
3. Supongamos que se descubre un mutante sensible a temperatura cuyo núcleo no puede acumular ciertas proteínas nucleares a temperatura elevada (restrictiva), pero que continúa acumulando otras especies. ¿Qué conclusiones se pueden extraer respecto de la localización en el núcleo y la naturaleza de esta mutación?
4. ¿De qué manera la reciente imagen del nucleosoma mostrada en la figura 12-11 ayuda a explicar por qué las histonas centrales son proteínas altamente conservadas?
5. Supongamos que la inactivación X no es un proceso al azar, sino que siempre conduce a la inactivación del cromosoma X derivado del padre. ¿Qué efecto sería de esperar sobre el fenotipo de las hembras?
6. Los cromosomas mostrados en la fotografía de la figura 12-A se marcaron mediante incubación de la preparación con fragmentos de DNA específico para cada uno de los diferentes cromosomas. Supongamos que uno de los cromosomas en el campo contiene regiones con dos colores diferentes. ¿Cuál sería su conclusión respecto de este cromosoma?
7. El rastro de color verde en la figura 12-25, a, se obtuvo incubando la célula con una sonda DNA complementaria a la porción transcrita del gen fibronectina. ¿En qué sería diferente la localización de la fluorescencia verde si la sonda DNA fuera complementaria de uno de los muchos intrones en el gen de fibronectina en vez de uno de los exones?
8. ¿Cuál sería la ventaja de tener transcritos sintetizados y procesados en ciertas regiones del núcleo en vez de procesados al azar a través del nucleoplasma?
9. Comparar y contrastar el efecto de una supresión en el gen operador del operón de lactosa con una en el operador del operón de histidina.
10. Si se encuentra un mutante de *E. coli* que produjo cadenas continuas de polipéptidos que contienen β -galactosidasa y galactósido permeasa (codificado por el gene *y*), ¿cómo se explicaría esto?

11. Se sospecha que una nueva hormona que se está probando funciona para estimular la síntesis de miosina al actuar a nivel de la transcripción. ¿Qué tipo de evidencia experimental se necesita para apoyar esta afirmación?
12. Supongamos que se efectúa una serie de experimentos en los cuales se trasplantan núcleos de diferentes tejidos de adultos a un huevo de anfibio enucleado y activado, y se observa que el huevo no se desarrolle más allá de la etapa de blástula. ¿Se podría concluir que el núcleo trasplantado ha perdido los genes necesarios para el desarrollo posterior a la blástula? ¿Por qué sí o por qué no? ¿Por qué razón este tipo de experimentos proporciona generalmente más información para la interpretación de resultados negativos?
13. Ciertas proteínas reguladoras de genes poseen una estructura notablemente similar, la cual se superpone sobre claras diferencias en su secuencia de aminoácidos. ¿Por qué sería de esperar que diferentes proteínas reguladoras de genes muestren estas notables similitudes y por qué sería de esperar diferencias claras?
14. Mencione dos mecanismos empleados por las células para producir un gran número de polipéptidos diferentes a partir de un número limitado de genes. En términos moleculares, ¿en qué difieren estos mecanismos entre sí?
15. Supongamos que se trabaja con una estirpe celular que muestra un nivel muy bajo de síntesis de proteínas, y se sospecha que las células son sometidas a control inhibitorio global de la traducción. ¿Qué experimentos se deben realizar para determinar si éste es el caso?

BIBLIOGRAFIA

Estructura y función nuclear

- Baskin, Y. 1995. Mapping the cell's nucleus. *Science* 268:1564-1565.
- Blackburn, E.H. 1992. Telomerases. *Ann. Rev. Biochem.* 61:113-129.
- Blackburn, E.H. 1994. Telomeres: No end in sight. *Cell* 77:621-623.
- Carter, K.C. y cols. 1993. A three-dimensional view of precursor messenger RNA metabolism within the mammalian nucleus. *Science* 259:1330-1335.
- Davis, L.I. 1995. The nuclear pore complex. *Ann. Rev. Biochem.* 64:865-896.
- Dingwall, C. y Laskey, R. 1992. The nuclear membrane. *Science* 258:942-947.
- Eden, S. y Cedar, H. 1995. Genomic imprinting: Action at a distance. *Nature* 375:16-17.
- Fabre, E. y Hurt, E.C. 1994. Nuclear Transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:335-342.
- Feldherr, C.M. ed. 1992. *Nuclear Trafficking*. Academic Press.
- Georgatos, S.D. y cols. 1994. Lamins and lamin-associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:347-353.
- Gilson, E. y cols. 1993. Telomeres and the functional architecture of the nucleus. *Trends Cell Biol.* 3:128-134.
- Hanover, J.A. 1992. The nuclear pore: At the crossroads. *FASEB J.* 6:2288-2295.
- Hoffman, M. 1993. The cell's nucleus shapes up. *Science* 259:1257-1259.
- Lyon, M. 1992. Some milestones in the history of X-chromosome inactivation. *Ann. Rev. Genetics* 26:17-28.
- Marx, J. 1994. Telomeres catch fire. *Science* 265:1656-1658.
- Mehlin, H. y Daneholt, B. 1993. The Balbiani ring particle: A model for the assembly and export of RNPs from the nucleus. *Trends Cell Biol.* 3:443-447.
- Moir, R.D. y Goldman, R.D. 1993. Lamin dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:408-411.
- Newmeyer, D.D. 1993. The nuclear pore complex and nucleocytoplasmic transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:395-407.
- Rout, M.P. y Wente, S.R. 1994. Pores for thought: Nuclear pore complex proteins. *Trends Cell Biol.* 4:357-365.
- Seachrist, L. 1995. Telomeres draw a crowd at Toronto cancer meeting. *Science* 268:29-30.

Spector, D.L. 1993. Macromolecular domains within the nucleus. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9:265-313.

Thurman, E. y Susman, M. 1993. *Human Chromosomes*, 3a. edición. Springer-Verlag.

Xing, Y. y Lawrence, J.B. 1993. Nuclear tracks: Structural basis for transcription and splicing? *Trends Cell Biol.* 3:346-353.

Yamasaki, L. y Lanford, R.E. 1992. Nuclear transport: A guide to import receptors. *Trends Cell Biol.* 2:123-126.

Metilación del DNA e impresión genómica

- Barlow, D.P. 1994. Methylation and imprinting: From host defense to gene regulation? *Science* 260:309-310.
- Bartolomei, M.S. 1994. The search for imprinted genes. *Nature Genetics* 6:220-221.
- Bird, A.P. 1993. Functions for DNA methylation in vertebrates. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58:281-285.
- Howlett, R. 1994. Taking stock in Stockholm. *Nature* 370:178-179.
- Razin, A. y Cedar, H. 1994. DNA methylation and genomic imprinting. *Cell* 77:473-476.
- Surani, M.A. 1994. Genomic imprinting. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:390-395.
- Verdine, G.L. 1994. The flip side of DNA methylation. *Cell* 76:197-200.

Estructura y transcripción de la cromatina

- Becker, P.B. 1994. The establishment of active promoters in chromatin. *Bioess.* 16:541-547.
- Clark, D. y cols. 1993. Chromatin structure of transcriptionally active genes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58:1-6.
- Hager, G.L. y cols. 1993. Influence of chromatin structure on the binding of transcription factors to DNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58:63-71.
- Kornberg, R.D. y Lorch, Y. 1992. Chromatin structure and transcription. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8:563-587.
- Morse, R.H. 1992. Transcribed chromatin. *Trends Biochem. Sci.* 17:23-26.
- Paranjape, S.M. y cols. 1994. Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Ann. Rev. Biochem.* 63:265-297.
- Richard-Foy, H. 1994. A way into the packaging. *Nature* 370:417-418.

- Travers, A.W. 1994. Chromatin structure and dynamics. *Bioess.* 16:657-662.
- Turner, B.M. 1993. Decoding the nucleosome. *Cell* 75:5-8.
- van Holde, K. 1993. The omnipotent nucleosome. *Nature* 362:111-112.
- van Holde, K. 1994. Properly preparing promoters. *Nature* 367:512-513.
- Wallrath, L.L. y cols. 1994. Architectural variations of inducible eukaryotic promoters preset and remodeling chromatin structures. *Bioess.* 16:165-170.
- Wolffe, A.P. 1992. *Chromatin Structure and Function*. Academic Press.
- Wolffe, A.P. 1994. Nucleosome positioning and modification: Chromatin structures that potentiate transcription. *Trends Biochem. Sci.* 19:240-244.
- Woodcock, C.L. y Horowitz, R.A. 1995. Chromatin organization reviewed. *Trends Cell Biol.* 5:272-277.

Factores de transcripción y control a nivel de la transcripción

- Baltimore, D. y Berg, A.A. 1995. DNA binding proteins: A butterfly flutters by. *Nature* 373:287-288.
- Cato, A.C.B. y cols. 1992. Regulation of gene expression by steroid hormones. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 43:1-36.
- Coleman, J.E. 1992. Zinc proteins: Enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 61:897-946.
- Engel, J.D. 1994. Meticulous AP-1 factors. *Nature* 367:516-517.
- Evans, T. y cols. 1990. Control of globin gene transcription. *Ann. Rev. Cell Biol.* 6:95-124.
- Freemont, P. 1993. Max in a complex affair. *Nature* 363:20-21.
- Funder, J.W. 1993. Mineralocorticoids, glucocorticoids, and response elements. *Science* 259:1132-1133.
- Greenblatt, J. 1992. Riding high on the TATA box. *Nature* 360:16-17.
- Groenmeyer, H. y Moras, D. 1995. Nuclear receptors: How to finger DNA. *Nature* 375:190-191.
- Grosschedl, R. y cols. 1994. HMG domain proteins: Architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genetics* 10:94-100.
- Grosveld, F. y cols. 1993. Regulation of human globin gene switching. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58:7-13.
- Heintz, N. y cols. 1991. Transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* 16:393-447.
- Herschbach, B.M. y Johnson, A.D. 1993. Transcription repression in eukaryotes. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9:479-509.
- Kassavetis, G.A. y Geiduschek, E.P. 1993. RNA polymerase marching backward. *Science* 259:944-945.
- Luisi, B.F. y cols. 1991. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 352:497-505.
- Pabo, C.O. y Sauer, R.T. 1992. Transcription factors: Structural families and principles of DNA recognition. *Ann. Rev. Biochem.* 61:1053-1095.
- Parker, M.P. 1993. Steroid and related receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:499-504.
- Pieler, T. y Therinissen, O. 1993. TFIIIA. Nine fingers-three hands. *Trends Biochem. Sci.* 18:226-230.
- Tijan, R. y Maniatis, T. 1994. Transcription activation: A complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 77:5-8.

- Tijan, R. 1995. Molecular machines that control genes. *Sci. Am.* 272:72-79 (marzo).
- Tsai, M.-J. y O'Malley, B.W. 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Ann. Rev. Biochem.* 63:451-486.
- von Hippel, P.H. 1994. Protein-DNA recognition: New perspectives and underlying themes. *Science* 263:769-770.
- Weintraub, H. 1993. Summary: Genetic tinkering-local problems, local solutions. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 58:819-836.
- Wolffe, A.P. 1994. Architectural transcription factors. *Science* 264:1100-1101.

Control a nivel de procesamiento

- Lamond, A.I. 1991. ASF/SF2: A splice site selector. *Trends Biochem. Sci.* 16:452-453.
- McKeown, M. 1992. Alternative mRNA splicing. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8:133-155.
- Schwarzbauer, J.E. 1991. Alternative splicing of fibronectin: Three variants, three functions. *Bioess.* 13:527-533.
- Smith, C.W.J. y cols. 1989. Alternative splicing in the control of gene expression. *Ann. Rev. Genetics* 23:527-577.

Control a nivel de la traducción

- Atwater, J.A. y cols. Regulated mRNA stability. *Ann. Rev. Genetics* 24:519-541.
- Bachvarova, R.F. 1992. A maternal tail of poly(A): The long and the short of it. *Cell* 69:895-897.
- Brown, A.J.P. 1993. mRNA translation and turnover: A cellular perspective on their relationship. *Trends Cell Biol.* 3:180-183.
- Cattaneo, R. 1991. Different types of messenger RNA editing. *Ann. Rev. Genetics* 25:71-88.
- Decker, C.J. y Parker, R. 1994. Mechanisms of mRNA degradation in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 19:336-340.
- Engelberg-Kulka, H. y cols. 1993. Translational introns: An additional regulatory element in gene expression. *Trends Biochem. Sci.* 18:294-296.
- Goldberg, A.L. 1995. Functions of the Proteasome: The lysis at the end of the tunnel. *Science* 268:522-523.
- Hershey, J.W.B. 1991. Translational control in mammalian cells. *Ann. Rev. Biochem.* 60:717-755.
- Jackson, R.J. 1993. Cytoplasmic regulation of mRNA function: the importance to the 3' untranslated region. *Cell* 74:9-14.
- Kislauskis, E.H. y Singer, R.H. 1992. Determinants of mRNA localization. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:975-978.
- Klausner, R.D. y cols. 1993. Regulating the fate of mRNA: The control of cellular iron metabolism. *Cell* 72:19-28.
- Kozak, M. 1992. Regulation of translation in eukaryotic systems. *Ann. Rev. Cell Biol.* 8:197-225.
- Melefort, O. y Hentze, M.W. 1993. Translational regulation by mRNA/protein interactions in eukaryotic cells: Ferritin and beyond. *Bioess.* 15:85-90.
- Sachs, A.B. 1993. Messenger RNA degradation in eukaryotes. *Cell* 74:413.
- Wickens, M. y Takayama, K. 1994. Deviants—or emissaries. *Nature* 367:17-18.

Duplicación y reparación del DNA

13-1 Duplicación del DNA

13-2 Reparación del DNA

La perspectiva humana: Deficiencias en la reparación por excisión de nucleótidos en el ser humano

La vía experimental: Papel de las deficiencias en la reparación por excisión de nucleótidos en el ser humano en la investigación para reparar el DNA

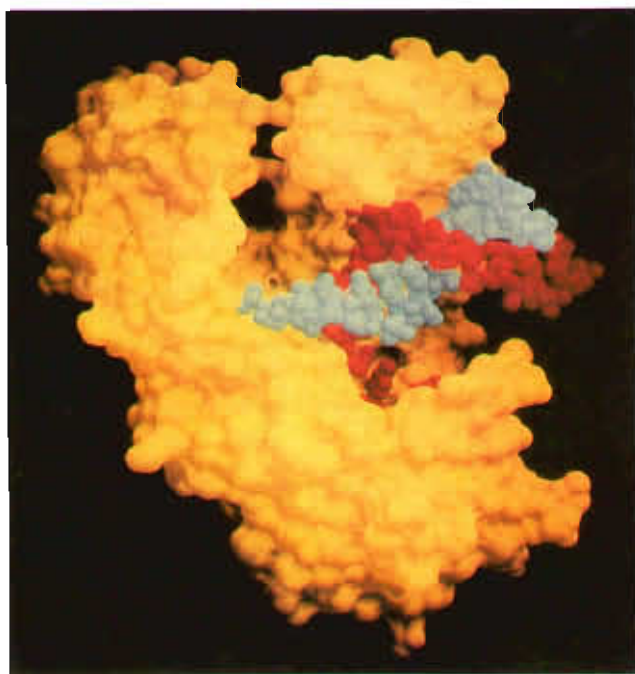


FIGURA 13-A. Modelo de una porción de la enzima bacteriana DNA polimerasa I (mostrada en amarillo) formando un complejo con DNA. La plantilla de la cadena de DNA se muestra en azul y la cadena iniciadora a la cual se añadirán los subsecuentes nucleótidos se muestra en rojo. (Cortesía de Thomas A. Steitz, Yale University.)

La capacidad de reproducirse es una de las propiedades fundamentales de todas las especies vivientes. Este proceso de duplicación se puede observar en varios niveles: los organismos lo hacen por reproducción sexual o asexual; las células, por división celular; y el material genético se autorreproduce por **duplicación (autorreproducción)**. El mecanismo que usan las células para la duplicación también tiene capacidad para efectuar otras acciones: reparar el material genético después que ha sufrido diferentes tipos de daño. Estos dos procesos, duplicación y reparación del DNA, serán el tema de este capítulo.

Se supone que la capacidad de autoduplicación es una de las propiedades fundamentales que aparecieron al principio del camino hacia la evolución de las primeras formas primitivas de vida. Sin la capacidad de propagarse, cualquier ensamblado primitivo de moléculas biológicas estaba destinado a desaparecer. Los primeros portadores de información genética probablemente fueron moléculas RNA con capacidad de autoduplicación (pág. 459). Conforme progresó la evolución y las moléculas de RNA prepararon el camino a las moléculas de DNA como material genético, el proceso de duplicación se fue haciendo cada vez más complejo, requiriendo numerosos materiales auxiliares. Por lo tanto, aunque una molécula de DNA contiene la información para su propia duplicación, carece de la capacidad para ejecutar la actividad por sí misma. Según escribió recientemente Richard Lewontin: "La imagen común del DNA como molécula autorreproductora es casi tan cierta como describir una carta como documento autoduplicante. La carta necesita una fotocopidora; el DNA necesita una célula." Veamos entonces cómo se las arregla una célula para efectuar esta tarea.

13-1 Duplicación del DNA

En 1953, Watson y Crick formularon la estructura del DNA y la acompañaron de una proposición para explicar su "autoduplicación". La proposición se apoyó en los puentes de hidrógeno que mantienen enlazada la doble cadena. Individualmente, estos puentes de hidrógeno son débiles y fáciles de romper. Watson y Crick percibieron que la duplicación ocurre por la separación gradual de las cadenas de la doble hélice (fig. 13-1), causada por la destrucción sucesiva de los puentes de hidrógeno, algo muy parecido a la separación de las dos mitades de un cierre automático (zipper). Puesto que las dos cadenas son complementarias entre sí, cada una contiene la información necesaria para construir la otra cadena. Por lo tanto, una vez separadas las cadenas, cada una actúa como plantilla para dirigir el ensamblado de los nucleótidos necesarios para formar la cadena complementaria y restablecer su estado de doble cadena.

Naturaleza semiconservadora de la duplicación

En la propuesta de Watson y Crick para explicar la duplicación se desprenden ciertas predicciones relacionadas con la conducta del DNA durante la duplicación; lo más impor-

tante es la separación física de las cadenas progenitoras durante el proceso. Según la propuesta, cada una de las dobles cadenas hijas debe componerse de una cadena completa procedente de la doble cadena progenitora y una cadena completa recién sintetizada. La duplicación de este tipo (fig. 13-2, esquema 1) se conoce como **semiconservadora**, puesto que cada célula hija recibe una mitad de la estructura original. En ausencia de información acerca del mecanismo encargado de la duplicación, se deben considerar otros dos tipos de duplicación. En un caso, el de la duplicación **conservadora** (fig. 13-2, esquema 2), las dos cadenas originales permanecerían juntas (luego de servir como plantillas) al igual que las dos cadenas recién sintetizadas. Como resultado, una de las células hijas sólo contiene la doble cadena conservada en su totalidad, en tanto que la otra célula hija sólo contiene DNA recién sintetizado. En el tercer caso, el de la duplicación **dispersiva** (fig. 13-2, esquema 3), la integridad de cada una de las cadenas progenitoras estaría interrumpida. Como resultado, las células hijas contienen dobles cadenas en las cuales cada una se compone de DNA antiguo y nuevo, o sea, ni las cadenas ni las dobles cadenas en sí se conservan.

Para decidir entre estas tres posibilidades es necesario distinguir las cadenas de DNA recién sintetizadas de las cadenas DNA originales que sirvieron como plantillas. Esto se logró por primera vez en 1958 en estudios efectuados sobre bacterias por Matthew Meselson y Franklin Stahl, del California Institute of Technology (fig. 13-3). Estos investigadores desarrollaron bacterias durante muchas generaciones en un medio que contenía ^{15}N -cloruro de amonio como única fuente de nitrógeno. Por consiguiente, las bases nitrogenadas del DNA de estas células sólo contenían el isótopo pesado de nitrógeno. Los cultivos de bacterias "pesadas" se lavaron para liberarlas del medio antiguo e incubaron en un medio fresco con compuestos que contenían ^{14}N , y luego se quitaron muestras a intervalos crecientes durante un periodo de varias generaciones. Se extrajo el DNA de las muestras de bacterias y se sometió a centrifugación con cloruro de cesio (sección 17-11). La posición donde se encuentra una molécula particular de DNA en equilibrio dentro de un gradiente de densidad de cloruro de cesio se relaciona directamente con su densidad de ascenso, que en este caso está directamente relacionada con el porcentaje de átomos ^{15}N en oposición a los átomos ^{14}N . Si la duplicación es semiconservadora, sería de esperar que la densidad del DNA disminuyera gradualmente hasta el punto que se alcanzara la edad de una generación (fig. 13-3, a). Esta disminución de la densidad debe ocurrir conforme se sintetizan cadenas ligeras junto con cadenas pesadas. Después de una generación, todas las moléculas de DNA deben ser híbridos ^{15}N - ^{14}N , y su densidad de ascenso debe ser igual a la mitad de la que se estima para el DNA totalmente pesado y el DNA totalmente ligero (fig. 13-3, a). Conforme continúa la duplicación después de la primera generación, las cadenas recién sintetizadas sólo siguen conteniendo isótopos ligeros, y aparecen dos tipos de dúplex en los gradientes: los que contienen híbridos ^{15}N - ^{14}N y los que contienen sólo ^{14}N . A medida que transcurre el tiempo de crecimiento en el medio ligero, un porcentaje cada vez mayor de las moléculas de DNA presentes serán ligeras. Sin embargo, si la

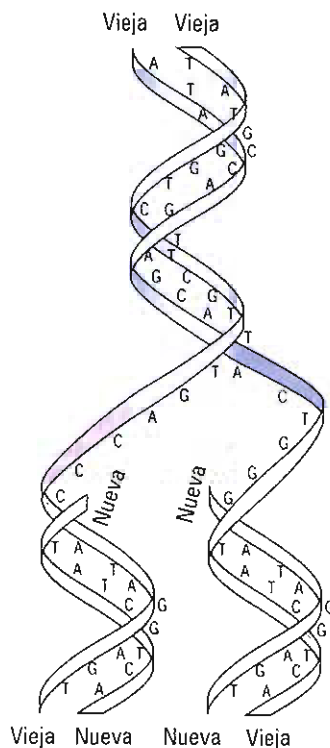


FIGURA 13-1. Proposición original de Watson y Crick para la duplicación de una molécula de DNA de doble hélice. Durante la duplicación, la doble hélice se desenrolla y cada una de las cadenas progenitoras sirve como plantilla para ensamblar una nueva cadena complementaria.

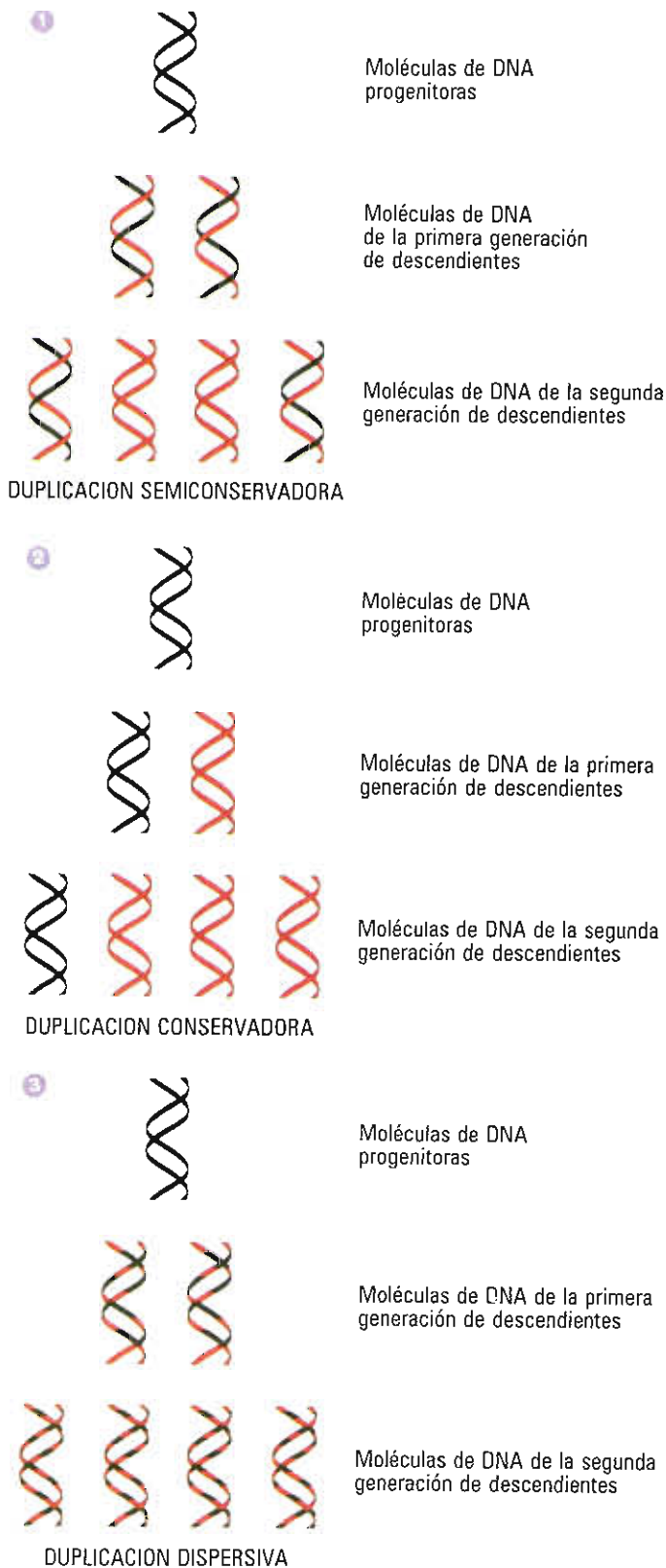


FIGURA 13-2. Tres esquemas alternativos de duplicación. En el esquema 1 se muestra la duplicación semiconservadora; en el esquema 2 la duplicación conservadora, y en el esquema 3 la duplicación dispersiva. En el texto se describen los tres modos alternativos de duplicación.

duplicación continúa siendo semiconservadora, las cadenas pesadas progenitoras originales deben permanecer intactas y presentes en las moléculas de DNA híbridas que representan cada vez un porcentaje más y más pequeño del DNA total (fig. 13-3, *a*). Los resultados de los experimentos del gradiente de densidad obtenidos por Meselson y Stahl se muestran en la figura 13-3, *b*, e indican que la duplicación ocurre de manera semiconservadora. En la figura 13-3, *a*, se presentan los resultados que se obtendrían si la duplicación ocurriera por mecanismos conservadores o dispersivos.

Pronto se demostró que la duplicación semiconservadora también ocurre en células eucariotas. El dibujo y la fotografía de la figura 13-4 muestran los resultados de un experimento en el cual se permitió que las células de mamífero cultivadas sufrieran dos ciclos de duplicación en bromodesoxiuridina (BrdU), un compuesto que se incorpora al DNA en lugar de timidinas. Cada cromosoma se forma a partir de dos cromátides: una cromátide compuesta de dos cadenas que contienen BrdU, en tanto que la otra cromátide es un híbrido con cadenas de BrdU y una cadena que contiene timidina. Esta última se presenta como parte de la molécula progenitora original del DNA antes de añadir BrdU al cultivo.

Duplicación en células bacterianas

En esta sección del capítulo se tratan los mecanismos de duplicación en células bacterianas, puesto que son más fáciles de entender que en los eucariotes. Los avances en la investigación de bacterias fueron impulsados por ciertas técnicas genéticas y bioquímicas que, hasta recientemente, no se podían emplear para estudiar sistemas eucariotes. Entre éstos se incluye:

- Disponibilidad de mutantes incapaces de sintetizar una u otra proteína necesaria para el proceso de duplicación. El aislamiento de mutantes incapaces de duplicar sus cromosomas puede parecer paradójico: ¿cómo se pueden cultivar células con este defecto? Las células mutantes incapaces de sintetizar un metabolito particular se pueden cultivar suministrándoles el compuesto requerido, pero nada se puede proporcionar a mutantes deficientes en una proteína requerida para su duplicación que les permita superar su deficiencia. La solución a este tipo de dificultad experimental se resuelve aislando mutantes *sensibles a temperatura (st)*. La deficiencia sólo se manifiesta en el mutante cuando la temperatura se eleva hasta cierto punto, denominada *temperatura no permisiva*. Cuando crecen a una temperatura menor (*permisiva*), el mutante puede producir su proteína de manera satisfactoria, lo bastante para efectuar la actividad requerida, y las células continúan creciendo y dividiéndose. Los mutantes sensibles a temperatura se pueden aislar prácticamente para cualquier actividad fisiológica y tienen particular importancia en el estudio de la síntesis de DNA conforme ocurre la duplicación, la reparación de DNA y la recombinación genética.
- Desarrollo de sistemas *in vitro* donde se pueda estudiar la duplicación utilizando componentes celulares puri-

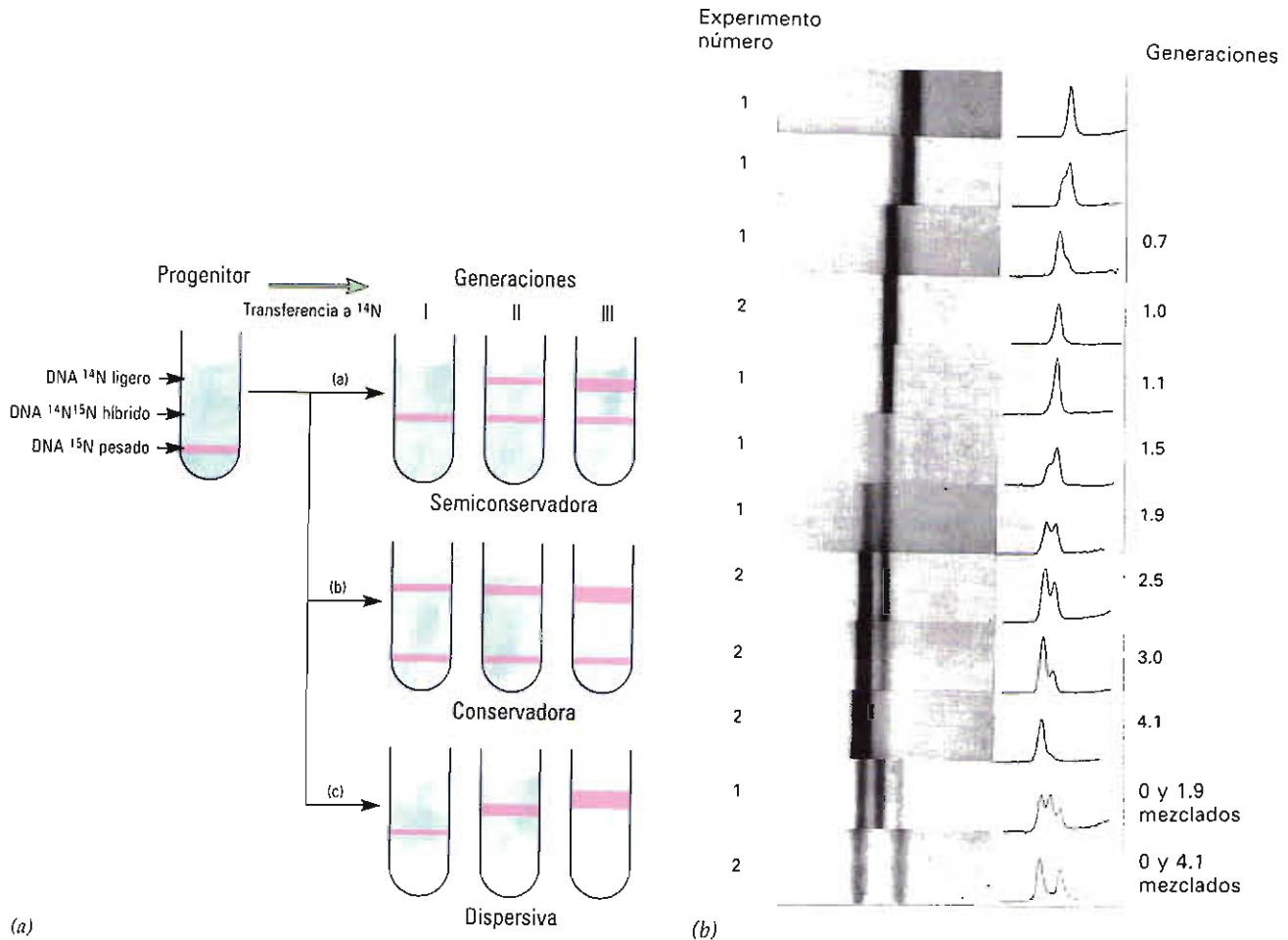


FIGURA 13-3. Demostración experimental de que la duplicación del DNA es semiconservadora en bacterias. En diferentes etapas del experimento se extrajo DNA de las bacterias, se mezcló con una solución concentrada de la sal cloruro de cesio (CsCl), se colocó en un tubo de centrifuga y se centrifugó a alta velocidad hasta alcanzar el equilibrio. Los iones de cesio tienen masa atómica suficiente para ser afectados por la fuerza centrífuga, y establecen un gradiente de densidad durante el periodo de centrifugación con la menor concentración (menor densidad) de Cs en la parte de arriba del tubo y la mayor concentración (mayor densidad) en el fondo del tubo. Durante la centrifugación, los fragmentos de DNA situados dentro del tubo se localizan en puntos donde la densidad es igual a su propia densidad, lo que a su vez depende de la relación $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ presente en sus nucleótidos. Cuanto mayor sea el contenido de ^{14}N , mayor será la altura de los fragmentos de DNA en el tubo al final del periodo de centrifugación. *a)* Resultados esperados en este tipo de experimento para cada uno de los tres posibles esquemas de duplicación. El tubo situado a la izquierda indica la posición del DNA progenitor y las posiciones de las bandas correspondientes a fragmentos de DNA totalmente ligeros o híbridos. *b)* Resultados experimentales obtenidos por Meselson y Stahl. La aparición de una banda híbrida y la desaparición de la banda pesada luego de una generación elimina la posibilidad de duplicación conservadora. La subsecuente aparición de dos bandas, una ligera y otra híbrida, elimina el esquema dispersivo. (*b)* Según M. Meselson y F. Stahl, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 44:671, 1958.)

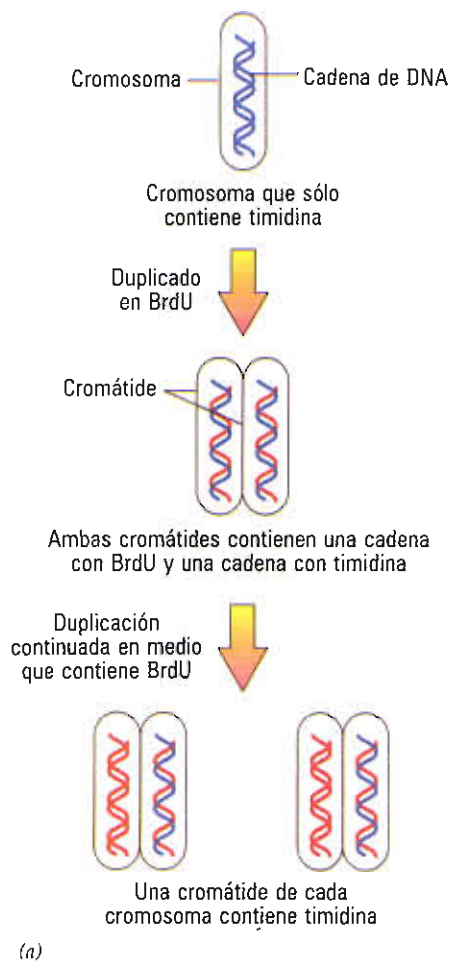
ficados. En algunos estudios, la molécula de DNA que debe duplicarse se incubó con extractos celulares de los cuales se eliminan proteínas específicas que se sospecha son esenciales. En otros casos, el DNA se incubó con varias proteínas purificadas cuya actividad debe probarse.

En conjunto, estas técnicas revelaron la actividad de cuando menos 30 proteínas diferentes necesarias para duplicar el cromosoma de *E. coli*. En el cuadro 13-1 se presenta una lista de algunas de las proteínas implicadas en la duplicación bacteriana. En las siguientes páginas analizaremos las actividades de varias de estas proteínas, cuyo papel está ahora claramente definido. En procariotes y eucariotes la

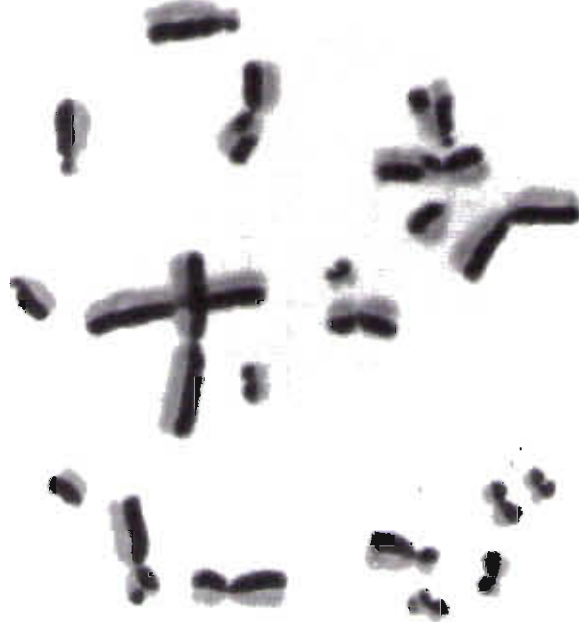
duplicación ocurre por mecanismos muy similares, y por lo tanto casi toda la información presentada en el análisis de la duplicación bacteriana también se aplica a células eucariotas.

Bifurcaciones de duplicación y duplicación bidireccional

Según el esquema semiconservador de duplicación, la separación del par de cadenas de la doble hélice se acompaña de la síntesis de un par de cadenas complementarias. A principios del decenio de 1960, John Cairns, de Cold Spring Harbor Laboratories, desarrolló una técnica autorradiográfica que suministró una notable imagen visual de este proceso. Cairns observó que se podían lisar bacterias con cuidado y dispersar sus cromosomas sobre una superficie sin



(a)



(b)

FIGURA 13-4. Demostración experimental de que la duplicación de DNA es semiconservadora en células eucariotas. *a)* Diagrama de los resultados de un experimento en el cual se permitió a las células sufrir una vuelta de duplicación en un medio con timidina y después se le transfirió a un medio con BrdU para las siguientes vueltas de duplicación. Las cadenas de DNA que contienen BrdU se muestran en rojo. *b)* Se muestran los resultados de un experimento similar al efectuado en *a*. En este experimento se desarrollaron células de mamífero en cultivo con BrdU durante dos vueltas de duplicación antes de preparar cromosomas mitóticos y teñirlos por un procedimiento empleando colorantes fluorescentes y tinción de Giemsa. Con este procedimiento, las cromátides que contienen timidina en una o ambas cadenas se tiñen de color oscuro, en tanto que las cromátides que sólo contienen BrdU se tiñen de color claro. La fotografía indica que después de dos vueltas de duplicación en BrdU, una cromátide de cada cromosoma duplicado sólo contiene BrdU, en tanto que la otra cromátide contiene una cadena de DNA marcada con timidina. (Se observa que algunos de los cromosomas intercambian partes homólogas entre cromátidos hermanas. Este proceso de intercambio de cromátidos hermanas es común durante la mitosis, pero no se analiza en el texto.) (*b*: Cortesía de Sheldon Wolff.)

manipulación adicional. Si las bacterias eran desarrolladas en ^3H -timidina antes de preparar los cromosomas, entonces la autorradiografía con microscopio de luz podía revelar la silueta de las cadenas de DNA marcadas, aunque la resolución del microscopio de luz fuera insuficiente para ver las propias moléculas. Las autorradiografías de este tipo (fig. 13-5) confirmaron la naturaleza circular de los cromosomas bacterianos y revelaron el patrón íntegro de la duplicación. En muchos casos se formó una silueta granulosa plateada denominada estructura *theta* (θ). En este perfil sería de esperar que una doble cadena circular fuera sorprendida en el acto de la duplicación, como se ilustra en la figura 13-6. Cada estructura *theta* se compone de tres DNA de longitud distinta, uno de los cuales representa la porción no duplicada del cromosoma y las otras dos el par de moléculas hijas

en proceso de formación. Los puntos donde el par de segmentos duplicados se unen con los segmentos no duplicados se denominan **bifurcaciones de duplicación**. Cada bifurcación de duplicación corresponde a un sitio donde: 1) la doble hélice progenitora sufre la separación de las cadenas y 2) se incorporan nucleótidos a las cadenas complementarias recién sintetizadas.

Según estas primeras autorradiografías y muchos estudios subsecuentes, se aclararon varios puntos generales. La duplicación comienza en un sitio específico sobre el cromosoma bacteriano denominado **origen**. El origen de la duplicación sobre los cromosomas de *E. coli* es una secuencia de casi 245 pares de bases llamada *oriC*, a la cual se unen algunas proteínas para iniciar el proceso de duplicación (véase figura 13-17 para una vista detallada). Por lo tanto, un sitio

CUADRO 13-1. Proteínas y genes que participan en la duplicación del DNA en *E. coli*

Proteína	Gen	Función
DnaA	<i>dnaA</i>	Proteína iniciadora: enlaza <i>oriC</i> ; promueve la abertura de la doble hélice; carga el DnaB
DnaC	<i>dnaC</i>	Forma complejos con DnaB; suministra DnaB al DNA
IHF	<i>himA</i> <i>hip</i>	Secuencia específica de la doble cadena DNA que se enlaza a proteínas; se enlaza a <i>oriC</i>
FIS	<i>fis</i>	Secuencia específica de la doble cadena DNA que se enlaza a proteínas; se enlaza a <i>oriC</i>
HU	<i>hupA</i> <i>hupB</i>	Proteína que se enlaza de manera inespecífica a la doble cadena DNA
RNA polimerasa	<i>rpoA</i> <i>rpoB</i> <i>rpoC</i> <i>rpoD</i>	Activación de la transcripción de <i>oriC</i> y <i>oriλ</i> , iniciador de la cadena delantera de ColE1
DnaK	<i>dnaK</i>	Proteína de choque de calor: desensambladora del complejo <i>oriλ</i> ; monomerización de P1 RepA
DnaJ	<i>dnaJ</i>	Proteína de choque de calor: marcado de proteínas por acción de DnaK
GrpE	<i>grpE</i>	Proteína de choque de calor: forma complejos con DnaK
DnaB	<i>dnaB</i>	Helicasa 5' → 3' y activadora de primasa
Primasa	<i>dnaG</i>	Iniciador de la síntesis
SSB	<i>ssb</i>	Se enlaza a cadenas DNA sencillas
PriA	<i>priA</i>	Ensamblado del primosoma precedente tipo θ X; helicasa 3' → 5' (factor n' o Y)
PriC	<i>priC</i>	Ensamblado del primosoma tipo θ X (proteína n'')
DnaT	<i>dnaT</i>	Ensamblado del primosoma tipo θ X (proteína i o factor X)
Holoenzima DNA polimerasa III		
α	<i>dnaE</i>	Polimerasa
ϵ	<i>dnaQ</i>	3' → 5' exonucleasa
θ	<i>holE</i>	Se desconoce
τ	<i>dnaX</i>	Dimerización de partículas centrales
γ	<i>dnaX</i>	
δ	<i>holA</i>	
δ'	<i>holB</i>	
χ	<i>holC</i>	
ψ	<i>holD</i>	Complejo γ ; carga de β dependiente de ATP sobre el extremo iniciador
β	<i>dnaD</i>	
Pol I	<i>polA</i>	Eliminación del iniciador y llenado de la brecha; síntesis inicial de la cadena delantera sobre ColE1
RNasa H	<i>rnh</i>	Eliminación del iniciador; procesamiento del iniciador para la síntesis de la cadena delantera sobre ColE1
Ligasa	<i>lig</i>	Unión de los fragmentos DNA nacientes
Girasa	<i>girA</i> <i>girB</i>	Polimerasa tipo II; eslabón giratorio durante la duplicación, superhélice DNA, desencadenamiento
Topo IV	<i>parC</i> <i>parE</i>	Desencadenamiento; posiblemente topoisomerasa II
TBP	<i>tus</i>	Enlace de proteína Ter: detención de la bifurcación de duplicación

FUENTE: T.A. Baker y S.H. Wickner. Reproducido con permiso de *Annual Review of Genetics*, vol. 26 © 1992 por Annual Reviews, Inc.

de origen para la duplicación es análogo de muchas maneras a un promotor para la transcripción, porque ambos tipos de secuencias reguladoras actúan como sitios de enlace para proteínas específicas que se enlazan a una secuencia de DNA iniciadora de la síntesis de DNA o de RNA en un sitio específico a lo largo de la plantilla.

Una vez iniciada, la duplicación prosigue alejándose del origen en ambas direcciones, o sea, en forma **bidireccional** (fig. 13-6). Las dos confluencias de duplicación se desplazan en direcciones opuestas hasta que encuentran un punto del círculo separado del origen, donde la duplicación concluye. Las dos nuevas cadenas duplicadas se separan y por último son orientadas al interior de dos células diferentes.

Propiedades de las DNA polimerasas

Iniciaremos el análisis de los mecanismos de duplicación del DNA describiendo algunas propiedades de las **DNA polimerasas**, las enzimas encargadas de construir nuevas cadenas de DNA. En el decenio de 1950, Arthur Kornberg, de la Universidad de Washington, inició el estudio de estas enzimas. En sus primeros experimentos Kornberg y sus colegas purificaron una enzima de extractos bacterianos que tenía capacidad de incorporar precursores de DNA radiactivos en un polímero ácido insoluble identificado como DNA. A esta enzima se le dio el nombre de **DNA polimerasa** (y después, luego del descubrimiento de nuevas enzimas polimerizantes de DNA, se le conoció como *DNA polimerasa I*). Para que la



FIGURA 13-5. Visualización de la duplicación en bacterias. Autorradiografía de un cromosoma de *E. coli* que ha sufrido cerca de 1.8 vueltas de duplicación en un medio que contiene ^3H -timidina. La densidad de los granos plateados suministra una estimación de la marca en esa porción del cromosoma. La línea punteada en el esquema representa una cadena no marcada; una línea sólida, una cadena marcada. Investigaciones posteriores revelaron que la duplicación de un cromosoma bacteriano ocurre por el desplazamiento de un par de bifurcaciones de duplicación a partir de un solo origen. (Según John Cairns, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28:44, 1963.)

reacción proceda, la enzima requiere la presencia de DNA y de cuatro trifosfatos de desoxirribonucleósido (dTTP, dATP, dCTP y dGTP). El análisis del producto radiactivo indica que el DNA sintetizado tiene la misma composición de bases que el DNA no marcado originalmente añadido. Como era de esperar, las cadenas de DNA añadidas sirvieron como *plantilla* para la reacción de polimerización suministrando las instrucciones para incorporar nucleótidos. En principio, la DNA polimerasa cataliza una reacción similar a la de una RNA polimerasa. Ambos tipos de polimerasa se desplazan a lo largo de una sola cadena de DNA leyendo cada nucleótido de la plantilla e incorporando un nucleótido complementario sobre el extremo de la cadena que se ensambla. Así, la reacción de ensamblado de una nueva cadena de DNA es prácticamente igual a la mostrada en la figura 11-5 para la síntesis de RNA, excepto que los precursores para RNA polimerasas son los trifosfatos de ribonucleósido, en tanto que

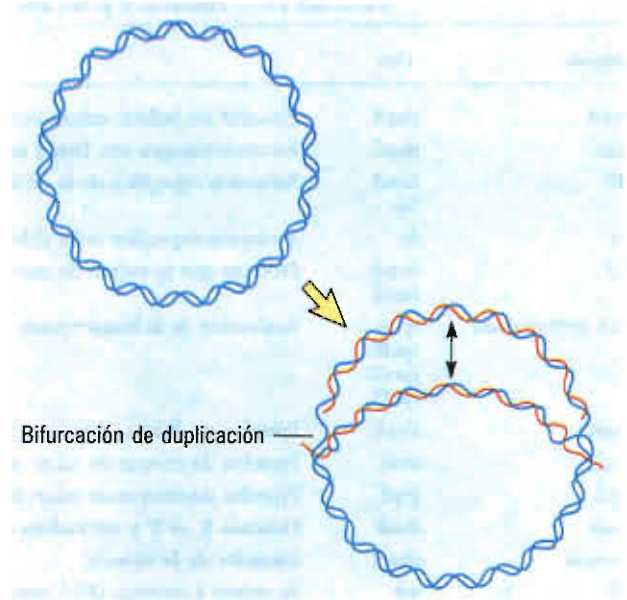


FIGURA 13-6. Modelo de un cromosoma circular que sufre duplicación semiconservadora bidireccional. Dos bifurcaciones de duplicación se mueven en direcciones opuestas a partir de un solo origen (flecha con dos cabezas). Las nuevas cadenas de DNA se muestran en rojo.

los de la DNA polimerasa son trifosfatos de desoxirribonucleósido.

Conforme se descubrieron más propiedades de la DNA polimerasa, la situación se complicó más. Cuando se probaron varios tipos de plantillas de DNA se observó que el DNA añadido tiene que satisfacer ciertos requerimientos estructurales para promover la incorporación de precursores marcados (fig. 13-7). Por ejemplo, una molécula de DNA de doble cadena intacta no puede estimular la incorporación. Esto no es sorprendente si se considera que como requisito las cadenas de la hélice deben estar preparadas para que ocurra la duplicación. Sin embargo, era menos evidente por qué una molécula circular de una sola cadena también estaba desprovista de actividad; podría esperarse que esta sea una plantilla ideal para dirigir la elaboración de una cadena complementaria. Por lo contrario, cuando se añade una molécula de DNA de doble cadena parcial a una mezcla de reacción que contenga la enzima polimerizante y los precursores marcados, se observa de inmediato la incorporación de nucleótidos.

La razón de que el círculo de cadena sencilla no tenga esta capacidad se debe a que la enzima no puede *iniciar* la formación de una cadena de DNA. Más bien, sólo puede añadir nucleótidos a la terminal 3' hidroxilo de una cadena existente. La cadena de DNA que suministra la enzima con la terminal 3' OH necesaria se denomina *iniciadora*. Todas las DNA polimerasas estudiadas hasta ahora poseen estos dos mismos requerimientos básicos (fig. 13-8, a): una plantilla de cadena de DNA para copiar y una cadena iniciadora a la cual se pueden añadir nucleótidos. El conocimiento de estos requisitos explica por qué ciertas estructuras de DNA no pueden promover la síntesis de DNA (fig. 13-7). Una

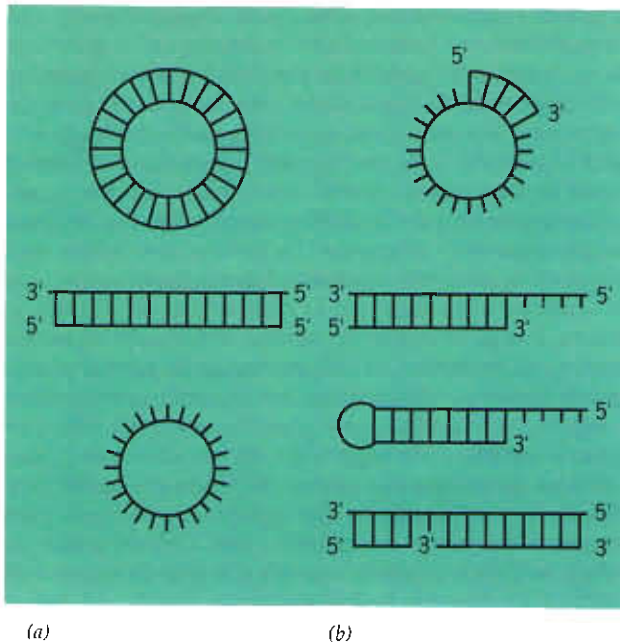


FIGURA 13-7. Plantillas y no plantillas para la actividad de la DNA polimerasa. *a)* Ejemplo de estructuras de DNA que no estimulan la síntesis de DNA *in vitro* mediante la acción de la DNA polimerasa aislada de *E. coli*. *b)* Ejemplo de estructuras de DNA que sirven como plantillas e iniciadores para la enzima. En todos los casos las moléculas de *b* contienen una cadena plantilla para copiar y una cadena iniciadora con un 3' OH sobre el cual se añaden nucleótidos.

doble hélice lineal intacta suministra la terminal 3' hidroxilo pero carece de actividad de plantilla. En contraste, una sola cadena circular suministra una plantilla pero carece de la actividad del iniciador. La molécula parcial de doble cadena satisface ambos requerimientos y por lo tanto promueve la incorporación de nucleótidos. El hallazgo de que la DNA polimerasa no puede iniciar la síntesis de una cadena de DNA plantea una pregunta distinta: ¿Cómo se inicia la síntesis de una nueva cadena en la célula? Retornaremos en breve a esta pregunta.

La DNA polimerasa purificada por Kornberg mostró otra propiedad difícil de entender en términos de su presunto papel como enzima duplicante: sólo era capaz de sintetizar DNA en la dirección 5' a 3' (escrita 5' → 3'). El primer diagrama presentado por Watson y Crick (fig. 13-1) incluye la esencia de lo que sería de esperar que ocurriera en la bifurcación de la duplicación. El diagrama sugiere que una de las cadenas recién sintetizadas es polimerizada en dirección 5' → 3', en tanto que la otra cadena se polimeriza en dirección 3' → 5'. ¿Existe alguna otra enzima encargada de la construcción de cadenas 3' → 5'? ¿Esta enzima opera de manera diferente en la célula en comparación con las condiciones *in vitro*? También retornaremos a esta cuestión.

Durante el decenio de 1960 hubo indicios de que la "enzima de Kornberg" no era la única DNA polimerasa en una célula bacteriana. Luego, en 1969, se aisló una cepa mutante de *E. coli* que mostró menos de 1% de la actividad normal de la enzima, pero que era capaz de multiplicarse a una tasa normal. Estudios posteriores rebelaron con clari-

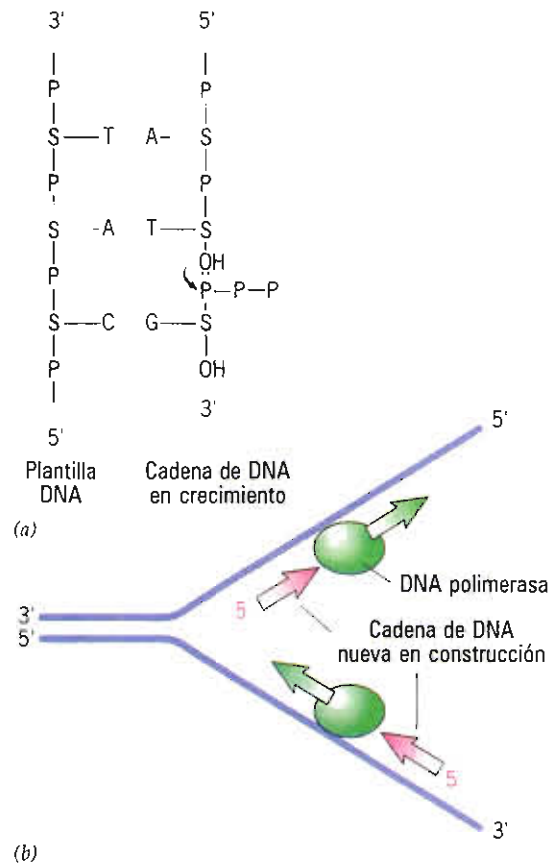


FIGURA 13-8. Incorporación de nucleótidos sobre el extremo 3' de una cadena en crecimiento por la acción de la DNA polimerasa. *a)* Polimerización de un nucleótido sobre el extremo 3' de la cadena iniciadora. La selección del nucleótido es determinada por la base del nucleótido en la cadena plantilla. *b)* Diagrama que muestra la dirección del movimiento de la polimerasa a lo largo de dos cadenas plantilla.

dad que la enzima de Kornberg, o DNA polimerasa I, era una de tres DNA polimerasas distintas presentes en células bacterianas; a las otras se les denominó *DNA polimerasa II* y *DNA polimerasa III*. Una célula bacteriana típica contiene entre 300 y 400 moléculas de DNA polimerasa I por célula y sólo unas 40 copias de DNA polimerasa II y 10 copias de DNA polimerasa III. La presencia de DNA polimerasa II y III está enmascarada por la cantidad mucho mayor de DNA polimerasa I en la célula. Se descubrió que de las tres enzimas, la DNA polimerasa III es la principal encargada de incorporar nucleótidos durante la duplicación del DNA (estudiado con mayor detalle en la página 557).¹ Pero el descubrimiento de otras DNA polimerasas no responde a las pre-

¹ Con frecuencia esta enzima se refiere como holoenzima de DNA polimerasa III, lo que significa que la proteína activa consta de varias subunidades accesorias además de la propia polimerasa. El centro catalítico de la holoenzima de DNA polimerasa III consta de tres subunidades (α , ϵ y θ). La holoenzima contiene siete subunidades adicionales, incluyendo la pinza deslizante β , que se muestra en la figura 13-18.

guntas planteadas antes; ninguna de las tres enzimas puede iniciar cadenas de DNA, ni puede construir cadenas en dirección $3' \rightarrow 5'$.

Duplicación semidiscontinua

La falta de actividad de polimerización en la dirección $3' \rightarrow 5'$ tiene una explicación más directa: no se pueden sintetizar cadenas de DNA en dicha dirección. Ambas cadenas recién sintetizadas se ensamblan en la dirección $5' \rightarrow 3'$. Las moléculas de las polimerasas encargadas de construir las dos nuevas cadenas de DNA se mueven en dirección opuesta a lo largo de sus respectivas plantillas, ambas procedentes en dirección $3' \rightarrow 5'$ a lo largo de la plantilla y construyendo una cadena que crece a partir de su terminal $5'$ -P (fig. 13-8). Por consiguiente, una de las cadenas recién sintetizadas crece hacia la bifurcación de duplicación donde las cadenas de DNA se separan, en tanto que la otra crece alejándose de la misma. Aunque esto resuelve el problema en relación con una enzima que sólo puede sintetizar una cadena en una dirección, genera un dilema aún más difícil. Es evidente que la cadena que crece hacia la confluencia se puede construir mediante adición continua de nucleótidos a su extremo $3'$. ¿Pero cómo se sintetiza la otra cadena? Pronto se consiguieron datos que indican que la cadena que crece alejándose de la confluencia de duplicación se sintetiza

de manera *discontinua*, o sea, como fragmentos (fig. 13-9). Antes de iniciarse la síntesis de un fragmento se debe exponer un tramo adecuado de la plantilla por desplazamiento de la bifurcación de duplicación. Una vez iniciada ésta, cada fragmento crece alejándose de la bifurcación de duplicación hacia el extremo $5'$ de un fragmento previamente formado al cual se une posteriormente. Por lo tanto, las dos cadenas recién sintetizadas de las dobles cadenas hijas se sintetizan por procesos muy diferentes. La cadena sintetizada continuamente se denomina **cadena adelantada** porque su síntesis continúa a medida que la confluencia de duplicación avanza. Por lo contrario, la cadena sintetizada de manera discontinua se denomina **cadena retrasada**, porque el inicio de cada fragmento debe esperar que las cadenas progenitoras se separen y expongan una plantilla adicional (fig. 13-9). Como se estudia en la página 557, tal vez ambas cadenas se sinteticen de manera simultánea, de modo que los términos adelantada y retrasada no son apropiados como se pensó cuando se acuñaron por primera vez. Debido a que una cadena se sintetiza continuamente y la otra de manera discontinua, se dice que la duplicación es *semidiscontinua*.

Reiji Okasaki, de la Universidad Nagoya de Japón, fue quien descubrió que una de las cadenas se sintetiza como fragmentos pequeños, según diferentes tipos de experimentos con partículas marcadas. Okasaki observó que si se ad-

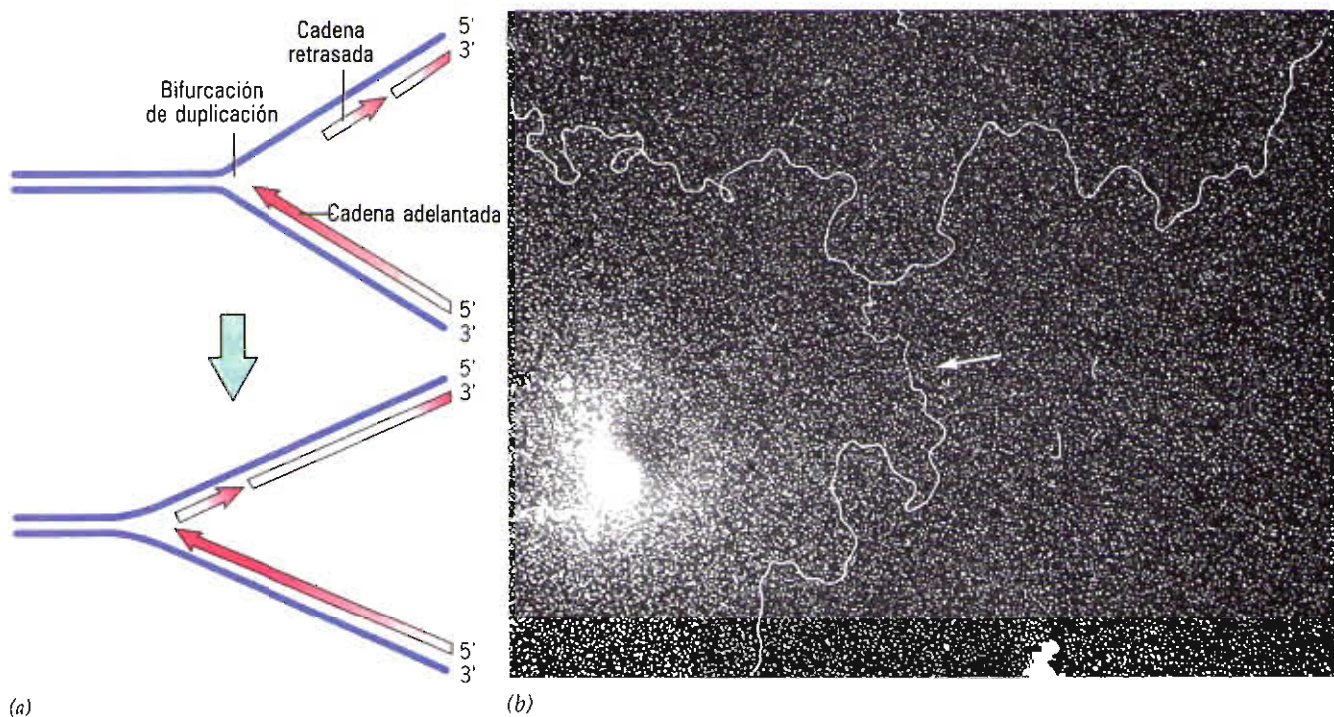


FIGURA 13-9. Las dos cadenas de una doble hélice se sintetizan mediante una secuencia diferente de acontecimientos. Las moléculas de DNA polimerasa sólo pueden desplazarse a lo largo de una plantilla $3' \rightarrow 5'$. En consecuencia, las dos cadenas recién ensambladas crecen en direcciones opuestas, una hacia la bifurcación de duplicación y la otra alejándose de la misma. Una cadena se ensambla de manera continua, la otra en segmentos que deben unirse mediante acción enzimática. a) Diagrama que muestra las diferencias en la síntesis de las dos cadenas. b) Micrografía electrónica de una molécula de DNA duplicante del bacteriófago que se observa como estructura en forma de $\sim$. Las dos ramas de la izquierda son las partes duplicadas de la molécula y el extremo derecho es la porción no duplicada. Se observa que la cadena retrasada del DNA duplicante contiene una porción expuesta de cadena simple, indicada por la flecha. (b: Según J. Wolfson y David Dressler, reproducido con permiso de Annual Review of Microbiology, vol. 29 © 1975 por Annual Reviews Inc.)

ministran a las bacterias pulsos breves de ^3H -timidina y de inmediato se les da muerte, gran parte de la radiactividad se podía encontrar como partes de fragmentos de DNA pequeños, de unos 1 000 a 2 000 nucleótidos de longitud. Por lo contrario, si después del pulso corto había un breve periodo de seguimiento, la radiactividad formaba parte de moléculas de DNA mucho mayores (fig. 13-10). Estos datos indican que una parte del DNA se construye en segmentos pequeños (llamados posteriormente **fragmentos Okasaki**) que rápidamente se unían a piezas más grandes sintetizadas previamente. La enzima encargada de unir los fragmentos Okasaki y formar una cadena continua se denomina **DNA ligasa**.

Al descubrirse que la cadena retrasada se sintetiza por pedazos, las dificultades para explicar el inicio de la síntesis fueron aún mayores. ¿Cómo se inicia la formación de cada

uno de estos fragmentos si ninguna de las polimerasas de DNA puede iniciar la cadena? Pronto se descubrió que el inicio no se debe a la DNA polimerasa, sino más bien a una enzima que construye un primer compuesto corto de RNA, o de DNA. La cadena retrasada, cuya síntesis comienza en el origen de la duplicación, al parecer se inicia por la acción de RNA polimerasa, la misma enzima encargada de sintetizar todo el RNA de las células bacterianas. La RNA polimerasa sintetiza un RNA iniciador corto, que en seguida se extiende gracias a la acción de la DNA polimerasa. En contraste, el RNA iniciador corto que comienza la síntesis de cada fragmento Okasaki de la cadena retrasada es ensamblado por un tipo distinto de RNA polimerasa conocida como **primasa**.

Los segmentos cortos de RNA situados en el extremo 5' de la cadena delantera y en el extremo 5' de cada fragmento Okasaki son eliminados subsecuentemente y la brecha resultante en la cadena se llena con DNA y después se sella. Estos sucesos se ilustran esquemáticamente en la figura 13-11. La formación de iniciadores RNA transitorios durante el proceso de duplicación del DNA es una actividad curiosa. Quizá sea mayor la probabilidad de cometer errores durante el inicio que durante el alargamiento, y el empleo de un segmento de RNA corto retirable evita la inclusión de bases no coincidentes.

Bifurcación de la duplicación

Duplicación significa algo más que la simple incorporación de nucleótidos. La formación de una molécula helicoidal de doble cadena circular (o de una molécula de DNA lineal gigante dentro de un cromosoma eucariota) plantea problemas topológicos mayores. Para entender las dificultades consideraremos brevemente una analogía entre un DNA dúplex y una tira helicoidal de doble cadena. Consideraremos lo que ocurre si se coloca un pedazo lineal de esta tira sobre el piso, sosteniendo las dos cadenas por uno de sus extremos, y a continuación se tira de las cadenas para separarlas justamente como se tira del DNA para separarlo durante la duplicación. Se puede notar que la separación de las cadenas de una doble hélice constituye también un proceso de *desenrollamiento* de la estructura. En el caso de la tira, que tiene libertad para girar alrededor de su eje, la separación de las cadenas a partir de un extremo se acompaña de un movimiento de rotación de toda la fibra como medio de oponerse al desarrollo de tensión dentro de la estructura. Consideremos ahora el resultado de separar las cadenas si el otro extremo de la tira se encuentra fijo a un gancho sobre la pared (fig. 13-12). En estas circunstancias, la separación de las cadenas a partir de su extremo libre genera una fuerza de torsión creciente en la tira y provoca que la porción no separada se enrolle cada vez más apretadamente. La separación de las dos cadenas de una molécula de DNA circular (o una molécula lineal que no sea libre de girar, como ocurre en un gran cromosoma eucariota) es análogo a tener un extremo de la molécula lineal fijo en la pared; en todos estos casos, la tensión desarrollada dentro de la molécula no puede liberarse por rotación de toda la molécula. Por consiguiente, el DNA situado en la parte posterior de la confluencia de duplicación comienza a formar una superhélice positiva (pág. 400). Si se conside-

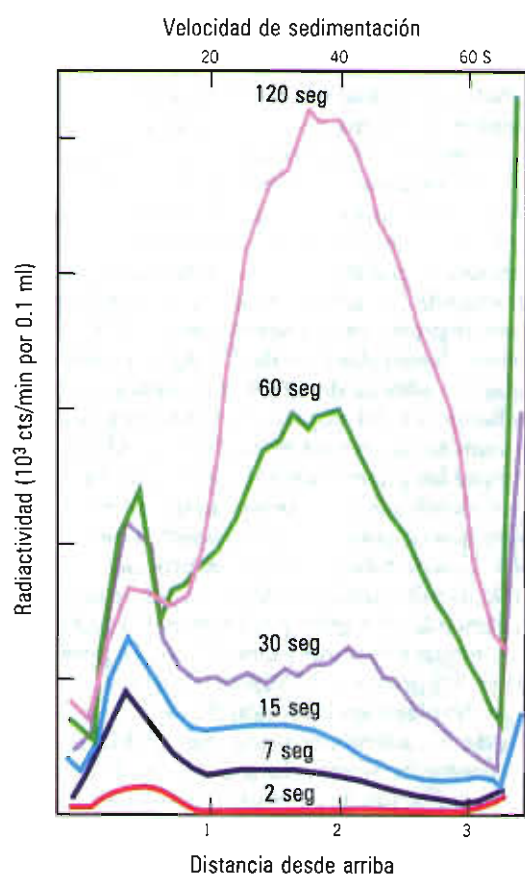


FIGURA 13-10. Resultado de un experimento para demostrar que parte del DNA se sintetiza en forma de fragmentos pequeños. Perfil de densidades en un gradiente de sacarosa del DNA procedente de un cultivo de células de *E. coli* infectadas por un fago. Las células se marcaron durante periodos cada vez más prolongados y se determinó la velocidad de sedimentación del DNA marcado. Cuando se preparó DNA después de pulsos muy breves, un porcentaje significativo de la radiactividad apareció en pedazos muy cortos del DNA (representados por el pico cerca de la parte de arriba del tubo a la izquierda). Luego de periodos más prolongados, los fragmentos marcados con DNA se unieron a moléculas de peso molecular más elevado. (Según R. Okazaki y cols. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33:130, 1968.)

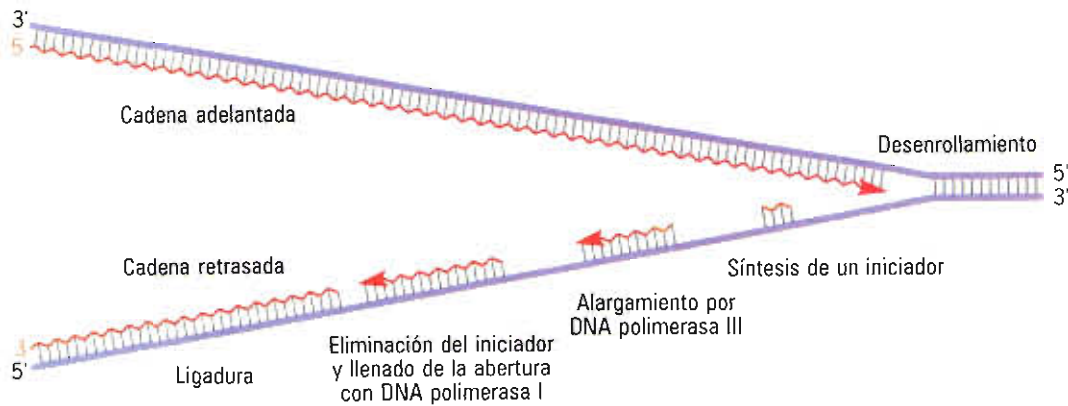


FIGURA 13-11. Empleo de fragmentos de RNA cortos como iniciadores removibles para iniciar la síntesis de cada fragmento de Okazaki de la cadena retrasada. En el dibujo se indican los primeros pasos. En las siguientes figuras se indica el papel de varias proteínas accesorias en esta actividad. (Según T. Ogasawa y T. Okajaki, reproducido con permiso de Annual Review of Biochemistry, volume 49 © 1980 por Annual Reviews Inc.)

ra que el cromosoma circular completo de *E. coli* contiene casi 400 000 vueltas y se duplica en 40 minutos a partir de dos confluencias, será aparente la magnitud del problema.

En la página 401 se hizo notar que las células contienen enzimas, denominadas topoisomerasas, capaces de cambiar el estado de superhélice en una molécula de DNA. Una enzima de este tipo, denominada **DNA girasa**, desempeña un papel crítico para aliviar la tensión formada durante la duplicación desplazándose a lo largo del DNA y actuando como “eslabón giratorio” que cambia la superhélice positiva del DNA en una superhélice negativa de DNA. La enzima puede efectuar esta notable proeza desdoblado ambas cadenas del DNA dúplex, pasando un segmento del DNA a través de la doble cadena rota hacia el otro lado y luego sellando las partes cortadas, proceso que es gobernado por la energía liberada durante la hidrólisis de ATP (fig. 13-13).

Se piensa que la conversión de una superhélice de DNA positiva a negativa tiene importancia para las actividades que ocurren en la bifurcación de duplicación. La superhélice

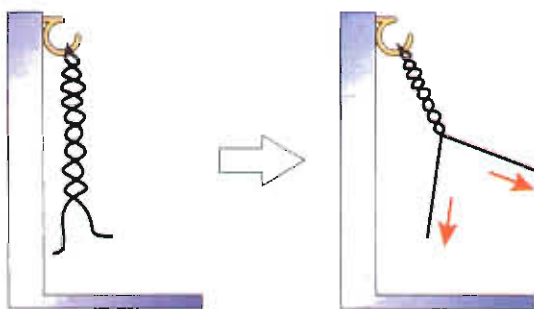


FIGURA 13-12. Efecto del desenrollamiento de una cuerda de dos hilos que tiene un extremo unido a un gancho. Se origina el mismo problema cuando se intenta desenrollar una molécula de DNA circular de doble cadena.

ce de DNA se encuentra sometida a estrés mecánico y, por consiguiente, almacena la energía que le confiere una tendencia persistente a desenrollar regiones localizadas de la hélice. Como resultado, la superhélice de DNA negativa en la bifurcación de duplicación se encuentra lista para iniciar el desenrollamiento y la separación. Incluso a pesar de esta fuerza motriz impulsora, el desenrollamiento del dúplex y la separación de las cadenas requiere la ayuda de dos tipos diferentes de proteínas que se enlazan al DNA, una **helicasa** (o proteína desenrolladora de DNA) y **proteínas únicas enlazadas a cadenas de DNA**. Las helicasas efectúan el desenrollamiento del dúplex mediante una reacción en la cual se emplea la energía liberada por hidrólisis de ATP para romper los puentes de hidrógeno que mantienen unidas a las dos cadenas. *E. coli* posee cuando menos 11 helicasas diferentes que emplea en varios aspectos del metabolismo del DNA. Una de estas proteínas, el producto del gen *dnaB*, sirve en la duplicación como la principal proteína desenrolladora abriendo el dúplex para exponer la cadena sencilla de DNA requerida como plantilla por la polimerasa. La helicasa se fija primero al DNA en el origen de la duplicación y se desplaza en dirección 5' → 3' a lo largo de la plantilla de la cadena retrasada (fig. 13-14), desdoblado la hélice conforme avanza. La separación de las cadenas se facilita por la fijación de las proteínas enlazadas a la cadena sencilla a las cadenas desnudas de DNA (fig. 13-14). Estas proteínas se enlazan selectivamente al DNA de cadena sencilla, conservándolo en estado extendido y evitando que se vuelva a enrollar.

Recordemos que una enzima especial denominada primasa tiene el papel de iniciar la síntesis de cada fragmento Okazaki. En las bacterias, la primasa y la helicasa están íntimamente relacionadas, formando lo que se denomina “primosoma”. El primosoma se desplaza a lo largo de la plantilla de la cadena retrasada de manera progresiva (o sea, sin separarse de la plantilla de la cadena durante el tiempo que persiste la bifurcación de duplicación). Conforme la helicasa “viaja” a lo largo de la plantilla de la cadena retrasada, abriendo las cadenas del dúplex, la primasa acom-

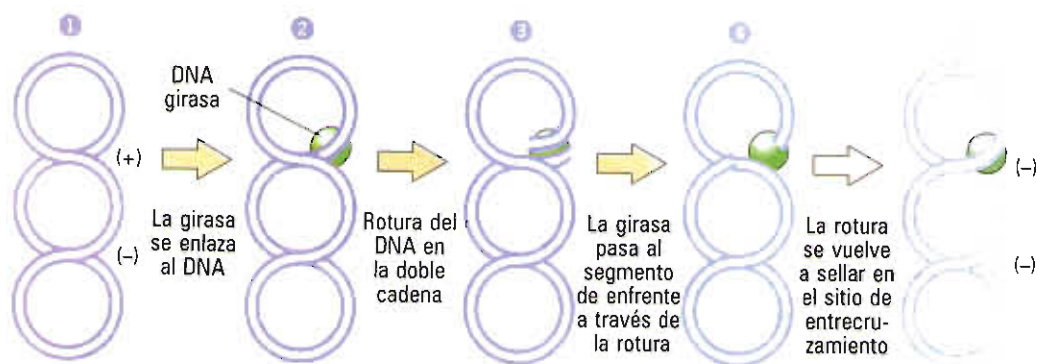


FIGURA 13-13. Modelo para el mecanismo de acción de una DNA girasa. La DNA girasa es una topoisomerasa de tipo II (pág. 401). En este ejemplo particular, la DNA girasa se añade a una molécula de DNA circular de doble cadena (paso 1). En el paso 2 la girasa se une al DNA en uno de los sitios de entrecruzamiento, envuelve un segmento de 105 a 140 pares de bases enrollándose sobre sí misma. En el paso 3, la girasa rompe un tramo de la doble cadena de DNA en la parte posterior del nudo positivo y pasa el segmento de enfrente a través de la rotura, invirtiendo el signo de la superhélice (paso 4). En el paso 5, la rotura se vuelve a cerrar en la parte de adelante del sitio de entrecruzamiento.

pañante inicia la síntesis de fragmentos de la cadena retrasada sintetizando iniciadores RNA cortos periódicamente en sitios específicos a lo largo de la plantilla de la cadena retrasada. Como se hizo notar antes, los iniciadores RNA se extienden subsecuentemente como DNA mediante la acción de la DNA polimerasa. En la figura 13-15 se muestra un dibujo esquemático del papel de todas las proteínas descritas antes.

Puesto que el inicio, el alargamiento y conclusión de los fragmentos de Okazaki ocurren con suma rapidez, se plantea la pregunta acerca de que si la misma molécula de DNA polimerasa III se emplea en la síntesis de los sucesivos fragmentos de la cadena retrasada o se reclutan nuevas moléculas de polimerasa en el citoplasma. Se ha intentado responder a esto mediante experimentos *in vitro* en los cuales la mezcla de reacción del DNA duplicante se diluye súbitamente. Si la polimerasa permanece unida al DNA conforme se sintetizan fragmentos sucesivos de Okazaki, entonces la dilución del medio no debe afectar su actividad. Por lo contrario, si se reclutan nuevas moléculas de polime-

rasa del medio, la dilución debe hacer mucho más lenta la síntesis de la cadena retrasada. Los resultados de estos experimentos apoyan la primera propuesta; una sola molécula de polimerasa III es reciclada desde el sitio donde acaba de concluir un fragmento de Okazaki hacia el siguiente sitio a lo largo de la plantilla de la cadena retrasada, donde volverá a iniciar la tarea de alargamiento del iniciador RNA corto que acaba de situarse bajo el primosoma.

El examen del diagrama de la figura 13-15 indica que el reciclamiento de la polimerasa hacia el siguiente fragmento de Okazaki requiere que la enzima se desplace hacia la bifurcación de duplicación. Se cree que la enzima logra esto "aprovechando un viaje" con el mecanismo de duplicación de la plantilla de la cadena delantera que se desplaza en esa dirección. Aunque las dos polimerasas se mueven en direcciones opuestas a lo largo de sus respectivas cadenas, pueden actuar como si fueran parte del mismo complejo de proteínas. Probablemente esto se logre manteniendo el DNA de la plantilla de la cadena retrasada en forma de asa inversa, lo que provocaría que esta plantilla tenga la misma orientación que la plantilla de la cadena delantera. Esto, a su vez, permitiría que ambas polimerasas se desplacen como parte de un solo complejo de duplicación, o *replisoma* (fig. 13-16, a), sin violar la "regla de direccionalidad" $5' \rightarrow 3'$ para la síntesis de la cadena de DNA. Una vez que la polimerasa ensambladora de la cadena retrasada alcanza el extremo $5'$ del fragmento de Okazaki sintetizada durante la vuelta previa, la plantilla de la cadena retrasada al parecer se libera (fig. 13-16, b) y posteriormente la polimerasa comienza a trabajar a nivel del iniciador RNA del siguiente fragmento de Okazaki situado a lo largo de la línea (fig. 13-16, c).

Inicio y conclusión de la duplicación

Nos hemos concentrado en las actividades que ocurren en la bifurcación de duplicación debido a que allí es donde se sintetiza realmente el DNA. En la página 550 se hizo notar que la duplicación comienza en un sitio específico sobre el cromosoma bacteriano llamado *oriC*. Este sitio posee algu-

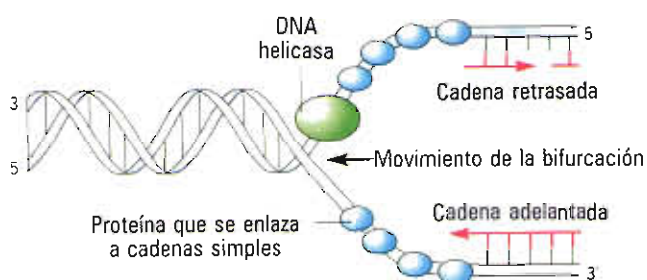


FIGURA 13-14. Papel de la DNA helicasa y de las proteínas que se enlazan a la cadena sencilla en la bifurcación de duplicación. La helicasa se desplaza a lo largo del DNA y cataliza el desenrollamiento controlado por el ATP dúplex. Conforme se desenrolla el DNA, las cadenas no pueden volver a unirse para reconstituir el dúplex por la acción de las proteínas de cadenas únicas enlazadas.

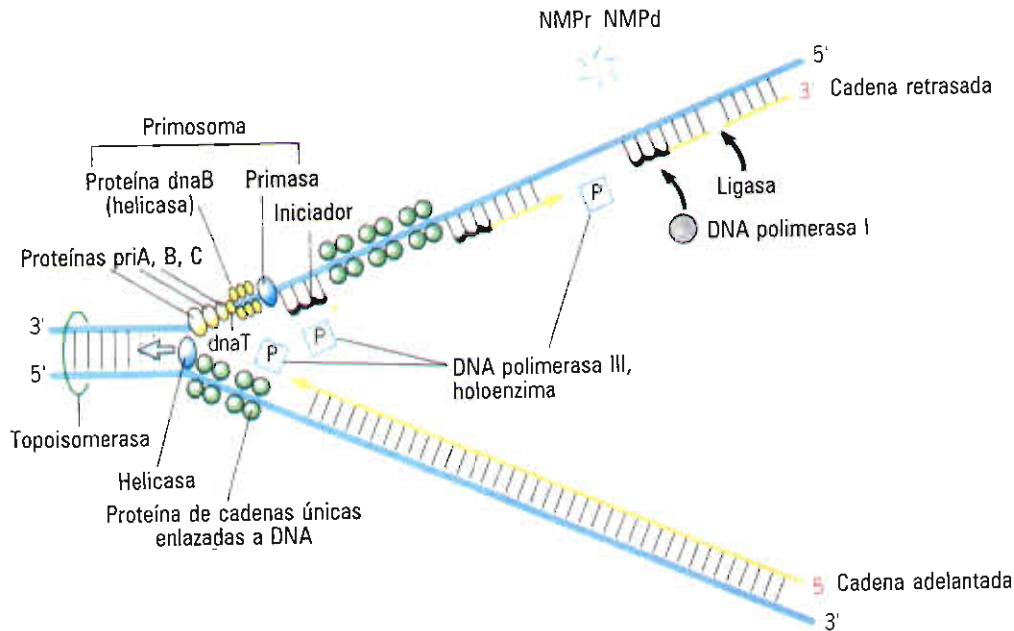


FIGURA 13-15. Resumen de las diferentes proteínas que participan en actividades en la bifurcación de duplicación de *E. coli*. (Según DNA Duplication por A. Kornberg y T.A. Baker. Copyright 1992 por W.H. Freeman & Company. Reimpreso con permiso.)

nas características únicas que desempeñan un papel en el ensamblado del mecanismo para la duplicación e inicio de la síntesis de cadenas de DNA. En la figura 13-17 se muestran los pasos de inicio de la duplicación. El primer paso es el enlace de cerca de 30 copias de una *proteína iniciadora* específica para una secuencia repetitiva de nucleótidos dentro del sitio *oriC*. Las moléculas de la proteína iniciadora forman un complejo con el DNA enrollado sobre su periferia, acontecimiento que induce a la separación de las cadenas de DNA en un sitio adyacente rico en pares de bases A-T. La separación de las cadenas va seguida por la entrada de una helicasa de DNA en la región de una sola cadena, la fijación de proteínas enlazadas a DNA de cadenas sencillas, y el reclutamiento de las otras proteínas necesarias para establecer una bifurcación de duplicación activa. Al parecer se ensamblan dos grupos de proteínas de duplicación en el origen, de modo que la bifurcación de duplicación puede proseguir en ambas direcciones a partir del origen. Las dos bifurcaciones de duplicación finalmente se encuentran en una región del cromosoma llamada *ter*, donde la duplicación concluye, las enzimas duplicativas se desconectan de los sitios donde se asocian al DNA, y los dos cromosomas hijos se separan. Este último proceso es mediado por una topoisomerasa especial.

El control de la duplicación se ejerce en el origen. Una vez ensamblado el mecanismo de duplicación y que la bifurcación de duplicación se desplaza hacia afuera del origen, la duplicación continúa en la célula hasta que todo el cromosoma se duplica. Por lo tanto, si ocurre o no la duplicación, depende del enlace de las proteínas reguladoras en el origen.

Estructura y función de las DNA polimerasas

Aún falta por responder la pregunta: ¿por qué una bacteria requiere tres DNA polimerasas diferentes? Todas las DNA polimerasas (en procariotes y eucariotes) tienen la misma actividad catalítica básica, que consiste en añadir desoxirribonucleótidos sobre el extremo en crecimiento de un iniciador de cadena sencilla; sin embargo, difieren en cuanto a los papeles que puedan desempeñar dentro de la célula. Con base principalmente en el análisis de diferentes tipos de cepas mutantes, se les pueden asignar los siguientes papeles. La enzima que actúa en la formación de la cadena de DNA durante la duplicación en *E. coli* es la DNA polimerasa III, la cual, por este papel principal en la duplicación, con frecuencia se le denomina *replicasa*. La holoenzima DNA polimerasa III (véase la nota del pie en la página 553) es mucho mayor que las otras dos polimerasas, contiene una sola subunidad catalítica y cuando menos nueve subunidades diferentes acompañantes con varias funciones en el proceso de duplicación. Una de las subunidades no catalíticas, denominada subunidad β , al parecer se encarga de mantener a la polimerasa asociada a la plantilla de DNA. Las DNA polimerasas (igual que las RNA polimerasas) deben mostrar dos propiedades al parecer contrastantes. Tienen que permanecer asociadas a la plantilla sobre largos tramos para sintetizar una cadena complementaria continua. Al mismo tiempo, no se pueden fijar con tanta firmeza que les impida desplazarse de un nucleótido a la plantilla del siguiente. Un par de subunidades β que forman una estructura en forma de dona en la cual se extienden las moléculas de

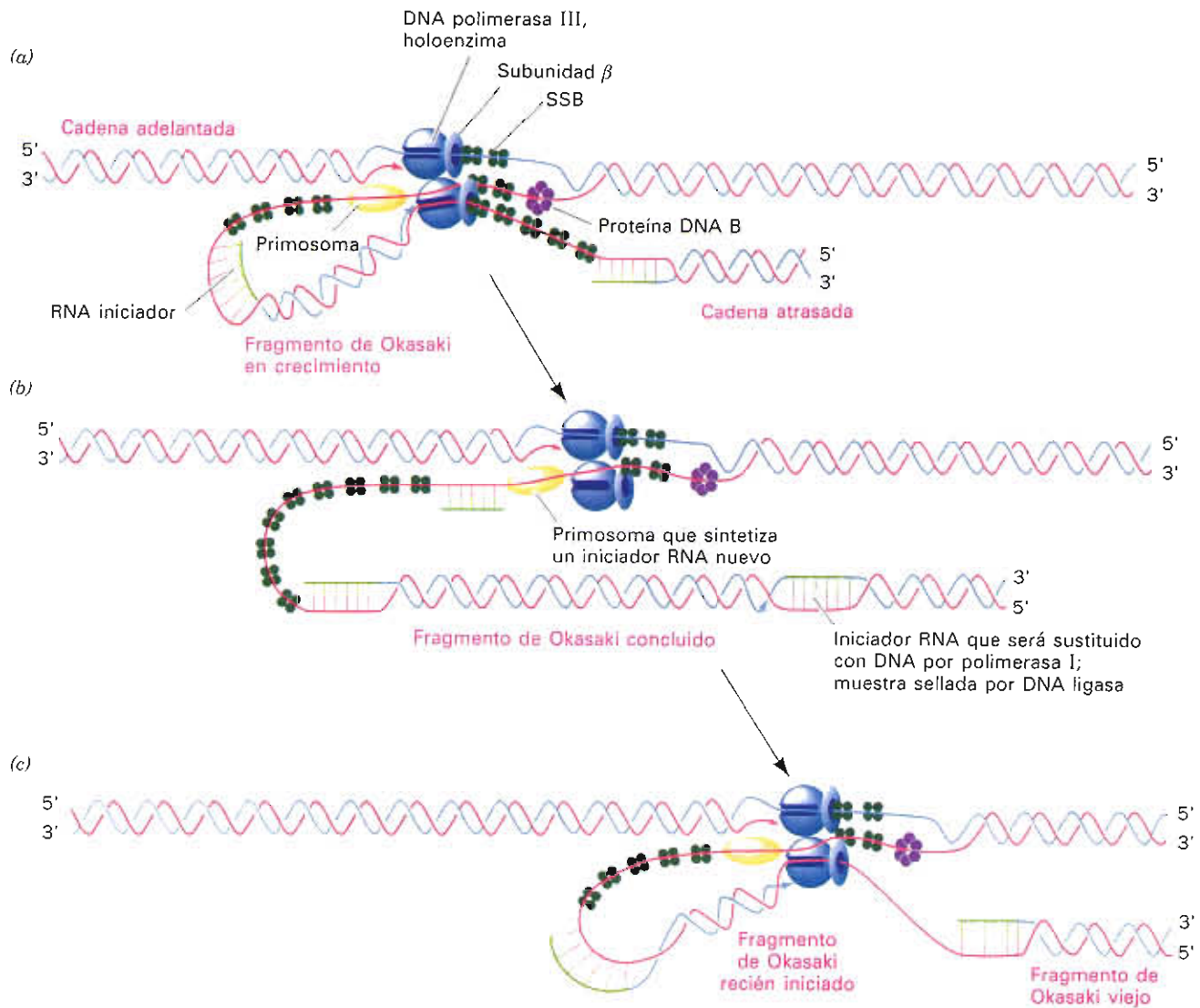


FIGURA 13-16. Duplicación de ambas cadenas, delantera y trasera, en *E. coli* efectuada por las DNA polimerasas que trabajan en conjunto en forma de un complejo único. *a)* Las dos moléculas de DNA polimerasa III (marcadas holoenzimas de DNA polimerasa) se mueven en la misma dirección, aunque avanzan hacia los extremos opuestos de sus respectivas plantillas. Esto se logra provocando la formación de un asa en la cadena retrasada. *b)* La polimerasa se libera de la plantilla de la cadena retrasada cuando encuentra el fragmento de Okazaki previamente sintetizado. Esto puede suministrar la señal que indica al primosoma que inicie la síntesis del siguiente iniciador de RNA sobre la cadena retrasada. *c)* La polimerasa que participa en el ensamblado del fragmento de Okazaki previo se vuelve a unir a la plantilla de la cadena retrasada a lo largo de su trayecto y sintetiza DNA sobre el extremo del iniciador de RNA que justamente acaba de construir el primosoma.

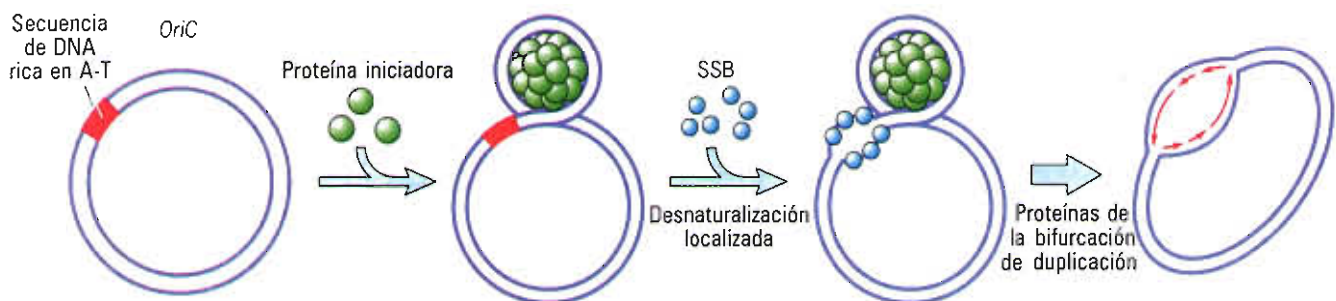
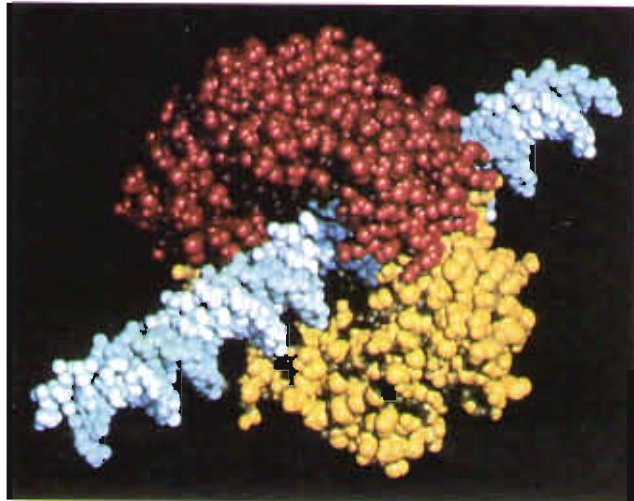
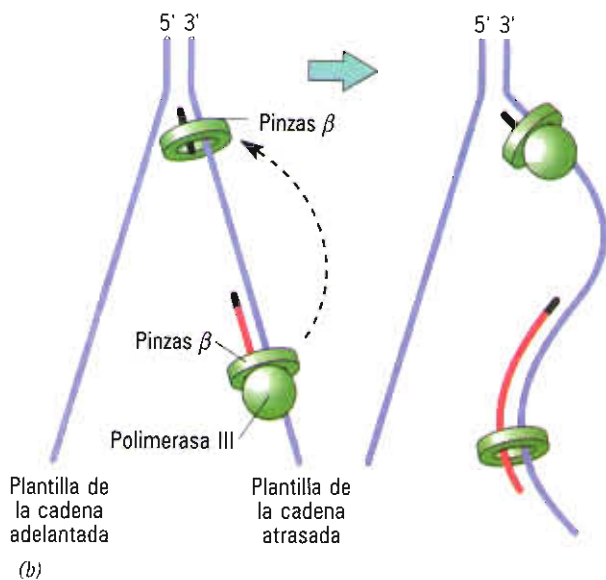


FIGURA 13-17. Inicio de la duplicación a nivel de *oriC* en *E. coli*. Los pasos se describen en el texto. (Según K.J. Marians, reproducido con permiso de Annual Review of Biochemistry, volume 62 © 1992 por Annual Reviews Inc.)

DNA a través del agujero central (fig. 13-18, a) suministran estas propiedades contrastantes. Las subunidades β se describen como "pinzas deslizantes" que permiten a la enzima moverse de un nucleótido al siguiente sin separarse de la plantilla. Cuando la enzima alcanza el extremo de un fragmento de Okazaki, la polimerasa se desengancha de las



(a)



(b)

FIGURA 13-18. La subunidad β de una DNA polimerasa III forma unas pinzas deslizantes. a) Modelo tridimensional que muestra las dos subunidades β que constituyen las pinzas deslizantes β en forma de aro de la holoenzima de DNA polimerasa III. El DNA se muestra en azul en las pinzas β . b) Diagrama de la polimerasa que rodea a la cadena retrasada. La polimerasa se sostiene sobre el DNA gracias a las pinzas deslizantes β y se desplaza a lo largo de la cadena de la plantilla para sintetizar la cadena complementaria. Después de concluir el fragmento de Okazaki, la enzima se desengancha de las pinzas β y rodea a unas nuevas pinzas en dirección hacia adelante del iniciador RNA (dibujo de la derecha). Las pinzas β originales quedan detrás del fragmento de Okazaki terminado. (a: Cortesía de John Kuriyan; b. según P.T. Stukenberg, J. Turner y M. O'Donnell, Cell 78:878, 1994, por cortesía de Cell Press.)

pinzas β y se une a unas nuevas pinzas que la esperan en un RNA iniciador situado hacia adelante (fig. 13-18, b).

Todavía no se conoce con certeza la función de la DNA polimerasa II. Se han aislado mutantes que carecen de esta polimerasa y no muestran deficiencia evidente. Se piensa que la DNA polimerasa I participa principalmente en la reparación del DNA, proceso mediante el cual se corrigen las partes dañadas de DNA (pág. 568). La DNA polimerasa I también es la enzima primaria que elimina a los iniciadores RNA en el extremo 5' de cada fragmento de Okazaki y lo sustituye por DNA (fig. 13-15). La capacidad de la enzima para efectuar esta tarea se analiza en la siguiente sección.

Actividad de exonucleasa de las DNA polimerasas

Para comprender el papel de las DNA polimerasas en la duplicación, es necesario considerar otra propiedad de estas enzimas: su capacidad para desdoblar un ácido nucleico polímero y también para sintetizarlo. Todas las polimerasas bacterianas poseen actividad de exonucleasa. Una exonucleasa es una enzima capaz de descomponer ácidos nucleicos eliminando los nucleótidos terminales uno a la vez. Hay exonucleasas 5' $\rightarrow$ 3' y exonucleasas 3' $\rightarrow$ 5', según en qué dirección avance la descomposición de la cadena. Además de su capacidad de polimerizar, la DNA polimerasa I tiene actividades de exonucleasa 3' $\rightarrow$ 5' y 5' $\rightarrow$ 3' (fig. 13-19). Estas tres actividades se encuentran en dominios diferentes del polipéptido sencillo. Por lo tanto, es notable que esta proteína prácticamente constituye tres diferentes enzimas en una. Las dos actividades de exonucleasas tienen papeles totalmente diferentes en la duplicación. Consideraremos primero la actividad de exonucleasa 5' $\rightarrow$ 3'.

La mayor parte de las nucleasas son específicas para DNA o para RNA, pero la exonucleasa 5' $\rightarrow$ 3' de la DNA polimerasa I puede descomponer cualquier tipo de ácido nucleico. La primasa deja un tramo de RNA en el extremo 5' de cada fragmento de Okazaki de la cadena retrasada, el cual será retirado por la exonucleasa 5' $\rightarrow$ 3' de la DNA polimerasa I (figs. 13-15 y 13-19, a). Puesto que la enzima elimina RNA, se cree que emplea su actividad de polimerasa para llenar la brecha resultante con DNA, el cual posteriormente se une mediante enlaces covalentes al extremo 3' del fragmento de DNA adyacente mediante la acción de la DNA ligasa.

Control de la mayor fidelidad durante la duplicación del DNA

La supervivencia de un organismo depende de la duplicación exacta del genoma. Un error cometido en la síntesis de una molécula de RNA mensajero por una RNA polimerasa provoca la síntesis de proteínas defectuosas, pero una molécula de RNAm sólo es una plantilla relativamente corta dentro de una gran población de dichas moléculas; por lo tanto, el daño resultante del error dura poco. En contraste, un error durante la duplicación produce una mutación permanente y la posible eliminación de la progenie de dicha célula. Se estima que la probabilidad de que un nucleótido determinado se copie de manera incorrecta durante la duplicación en *E. coli* es de casi 10^{-9} . En otras palabras, sólo uno de cada 1 000 millones de nucleótidos incorporados no

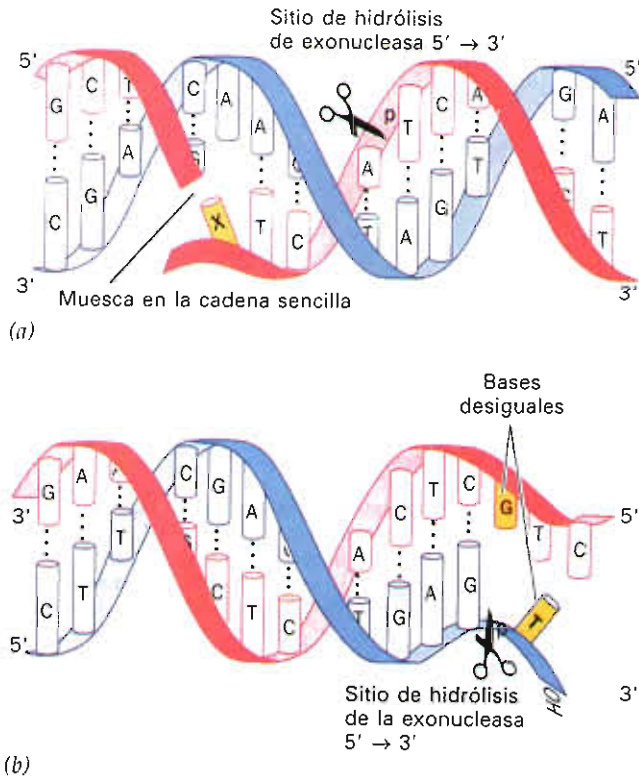


FIGURA 13-19. Actividades de exonucleasa de la DNA polimerasa I. *a)* La exonucleasa 5' → 3' elimina unos 10 nucleótidos del extremo 5' de una muestra en la cadena simple. Esta actividad desempeña un papel clave para eliminar los iniciadores RNA. *b)* La exonucleasa 3' → 5' sirve para extraer nucleótidos incorrectamente apareados del extremo 3' de la cadena de DNA en crecimiento. Esta actividad es vital para conservar la precisión de la síntesis de DNA.

es complementario del nucleótido correspondiente sobre la plantilla de la cadena. Puesto que el genoma de *E. coli* contiene casi 4×10^6 nucleótidos, esta tasa de error corresponde a menos de un nucleótido alterado por cada 100 ciclos de duplicación.

La incorporación de un nucleótido particular en un sitio determinado de la cadena en crecimiento se basa en la capacidad del trifosfato de nucleósido activo para formar un par de bases aceptable para el nucleótido de la plantilla de la cadena. El análisis de la distancia entre átomos y ángulos de unión indica que el par de bases A-T y G-C posee una geometría idéntica entre sí pero diferente de la de otros pares de bases. Como se muestra en la figura 13-20, una DNA polimerasa, que tiene un sitio al cual se unen cuatro trifosfatos de nucleósido, puede satisfacer las proporciones geométricas de los pares de bases situados entre posibles precursores y la plantilla conforme los precursores se mueven hacia adentro y hacia afuera del sitio activo. De los cuatro posibles trifosfatos de nucleósido que llegan, sólo uno formará un par de bases apropiado con la plantilla para producir un par de bases A-T o G-C. Cuando se forma el par de bases aceptable, la enzima cataliza la incorporación del nucleótido dentro de la cadena creciente.

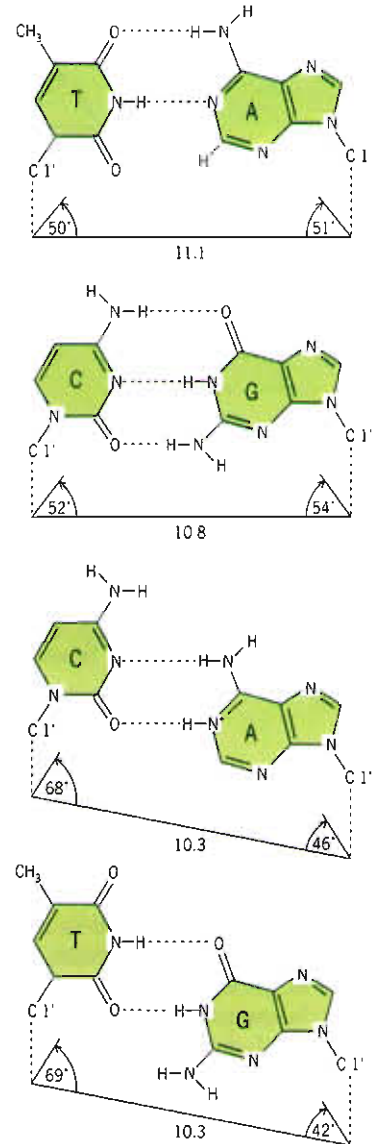


FIGURA 13-20. Características geométricas de un par de bases apropiado y pares de bases desiguales. (Según H. Echols y M.F. Goodman, reproducido de *Annual Review of Biochemistry*, volume 60 © 1991 por Annual Reviews Inc.)

En ocasiones, la polimerasa selecciona un nucleótido incorrecto para incorporación, y como resultado las bases del par no coinciden, o sea, el par de bases es diferente de A-T o G-C. Se estima que un par de bases incorrecto de este tipo ocurre casi una vez cada 10^5 a 10^6 nucleótidos incorporados, frecuencia mucho mayor que la tasa espontánea de casi 10^{-9} . ¿Cómo se mantiene tan baja la tasa de mutaciones normales? Parte de la respuesta reside en la segunda exonucleasa de las dos mencionadas antes, la exonucleasa con actividad 3' → 5', que se encuentra en las tres polimerasas bacterianas. Se cree que una base no coincidente será reconocida por la exonucleasa como resultado de su gran tendencia a separarse de la plantilla y formar

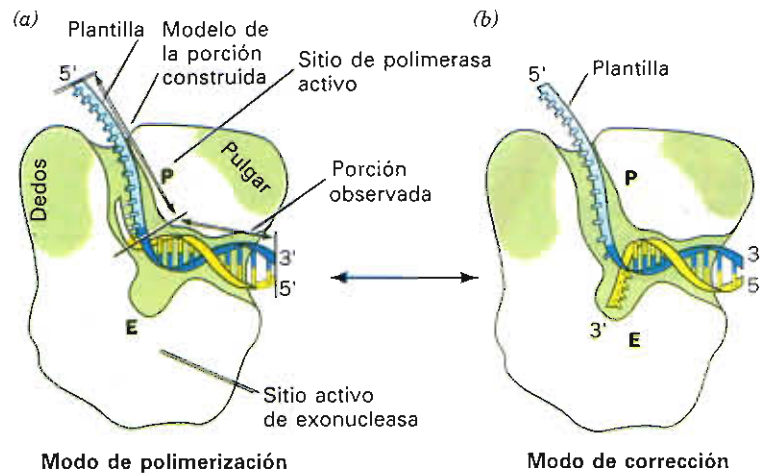


FIGURA 13-21. Activación de la exonucleasa 3' → 5' de la DNA polimerasa I. Modelo esquemático de una porción de la enzima que se conoce como fragmento Klenow, el cual contiene los sitios activos de la polimerasa (P) y de la exonucleasa 3' → 5' (E). La actividad de exonucleasa 5' → 3' se localiza en una parte diferente del polipéptido, que no se muestra en la figura. Con frecuencia las regiones del fragmento Klenow se comparan con una mano, y allí las porciones marcadas como "dedo" y "pulgar". La terminal 3' de la cadena en crecimiento puede alternarse entre los sitios activos de la polimerasa y de la exonucleasa. La adición de una base incorrectamente apareada al extremo de la cadena en crecimiento tiende a producir un extremo 3' libre que penetra en el sitio de la exonucleasa, de donde será eliminado. (Reproducido con permiso según L.S. Beese, V. Derbyshire y T.A. Steitz, *Science* 260:354, 1993; copyright 1993 American Association for the Advancement of Science.)

una cadena única con 3' terminal (fig. 13-21). Luego de la incorporación de un nucleótido incorrecto, la polimerasa se detiene en el sitio suministrando el tiempo necesario para que la exonucleasa de acción relativamente breve 3' → 5' elimine el nucleótido desajustado antes que pueda continuar el alargamiento de la cadena. Esta tarea de "corrección de pruebas" es una de las actividades enzimáticas más notables e ilustra el grado de perfeccionamiento del cual ha evolucionado la maquinaria molecular biológica. La exonucleasa de actividad 3' → 5' probablemente elimine casi 99 de cada 100 bases desajustadas, elevando la fidelidad a casi 10^{-7} a 10^{-8} . Además, las bacterias poseen un mecanismo, denominado reparación de desajustes, que opera después de la duplicación para corregir casi todos los desajustes que puedan escapar al paso de la corrección de pruebas. Así, en conjunto las actividades de selección inicial, corrección de pruebas inmediata, y la subsecuente reparación de los desajustes pueden explicar la tasa total de errores observada de casi 10%.

Una de las características más notables de la duplicación bacteriana es su velocidad. La duplicación de un cromosoma bacteriano íntegro en sólo 40 minutos a 37°C requiere que cada bifurcación de duplicación mueva casi 1 000 nucleótidos por segundo. La longitud de un fragmento Okazaki se encuentra en el mismo intervalo, lo que indica que todo el proceso, incluyendo la formación de un iniciador RNA, su alargamiento y corrección de pruebas efectuadas simultáneamente por la DNA polimerasa, y su enlace al resto de la cadena, debe ocurrir más o menos una vez por segundo. *E. coli* duplica su DNA en unos 40 minutos, pero se puede iniciar una nueva vuelta de duplicación antes que concluya la vuelta previa. Por consiguiente, cuando estas bacterias crecen a tasa máxima, pueden duplicar su número una vez cada 20 minutos.

Duplicación en células eucariotas

Como sería de esperar, nuestro conocimiento de la duplicación en células eucariotas todavía está muy por detrás del conocimiento en células procariotas. Este desequilibrio está cambiando con rapidez por el desarrollo de nuevos sistemas similares a los empleados durante decenios para estudiar la duplicación procariota. Entre éstos se incluyen:

- El aislamiento de células mutantes de levaduras incapaces de sintetizar productos específicos del gen requeridos para diferentes aspectos de la duplicación. Puesto que las proteínas de duplicación empleadas por las células de levadura son notablemente similares en estructura a las proteínas de las células eucariotas más elevadas, la información obtenida a partir del estudio de estas levaduras se puede aplicar principalmente a células de mamíferos.
- El desarrollo de sistemas *in vitro* en los cuales se puede duplicar DNA purificado utilizando extractos celulares o componentes purificados. En la mayor parte de los estudios *in vitro* de duplicación de mamíferos se emplean plantillas preparadas a partir de genomas virales más simples de los que normalmente se pueden duplicar en estas células. Por ejemplo, el DNA del virus SV40 del mono contiene un solo origen de duplicación, que actúa como sitio para el enlace de una proteína codificada por el virus, llamada *antígeno T grande*. Otra proteína del virus diferente de ésta, que se enlaza al origen SV40 para iniciar la duplicación, libera el mecanismo de duplicación de la célula huésped para duplicar su genoma, y esto permite a los investigadores estudiar el papel de las proteínas celulares específicas para duplicación en el tubo de ensaye.

En general, la duplicación es muy semejante cualquiera que sea el tipo de gen duplicado: viral, procariota o eucariota. Todos estos sistemas requieren proteínas no enrolladas, proteínas que se enlazan al DNA de una sola cadena, topoisomerasas, primasas, DNA polimerasas y ligasas. Igual que en los procariotes, el DNA de las células eucariotas se sintetiza de manera semidiscontinua, aunque los fragmentos de Okazaki de la cadena retrasada son considerablemente más pequeños que en las bacterias, con un promedio de longitud cercana a 250 nucleótidos. Hasta la fecha se han aislado cinco diferentes DNA polimerasas de células eucariotas, y se les designa α , β , γ , δ y ϵ . La polimerasa α está íntimamente relacionada con la primasa, que inicia la síntesis de los iniciadores en el extremo 5' de cada fragmento de Okazaki conforme el complejo polimerasa-primasa se desplaza a lo largo de la plantilla de la cadena retrasada. Al parecer, la cadena delantera y la mayor parte de los fragmentos de la cadena retrasada son ensamblados por la polimerasa δ . La polimerasa γ duplica el DNA mitocondrial y la polimerasa β sirve para la reparación del DNA. El papel de la polimerasa ϵ es más problemático, aunque al parecer desempeña algún papel en la duplicación del DNA nuclear que no se puede efectuar en células que carecen de esta polimerasa.

Igual que las polimerasas procariotas, todas las enzimas eucariotas alargan cadenas de DNA en la dirección 5' $\rightarrow$ 3', añadiendo nucleótidos a un grupo 3' hidroxilo y ninguna de ellas puede iniciar la síntesis de una cadena de DNA sin un iniciador. La mayor parte de las DNA polimerasas eucariotas han mostrado hasta ahora que poseen actividad de exonucleasa 3' $\rightarrow$ 5', garantizando que la duplicación ocurra con un alto grado de precisión. Sólo la polimerasa β carece de actividad de exonucleasa.

Aunque los primeros experimentos autorradiográficos acerca de la duplicación de bacterias indicaron que la duplicación de su cromosoma se inicia en un solo sitio, experimentos de tipo similar con células eucariotas sugieren que la duplicación ocurre simultáneamente en muchos sitios a lo largo del cromosoma (fig. 13-22). Las células de los organismos elevados poseen mucho más DNA que las bacterias, y las polimerasas eucariotas incorporan nucleótidos al DNA a una tasa mucho menor. Para duplicar un cromosoma entero en un tiempo razonable, el DNA eucariota se duplica en unidades más pequeñas, llamadas *duplicones*. En los cromosomas eucariotas, los duplicones en general tienen entre 15 y 100 μ m de longitud (50 a 300 kilobases), y cada uno tiene su propio origen a partir del cual las bifurcaciones de duplicación prosiguen hacia afuera en ambas direcciones (fig. 13-22).

Inicio de la duplicación

El inicio de la síntesis de DNA en un duplicón determinado al parecer está sometido a regulación considerable. Los duplicones localizados en sitios cercanos dentro de un cromosoma determinado tienden a sufrir duplicación de manera simultánea (evidente en la figura 13-22). Más aún, los duplicones activos en un momento particular durante una vuelta de síntesis de DNA (fase S, cap. 14) tienden a mostrarse activos en una etapa comparable durante vueltas sucesivas. Por lo tanto, el momento en que una región par-

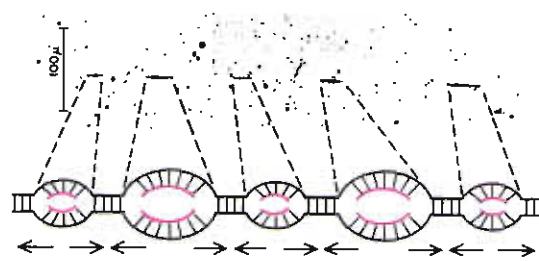


FIGURA 13-22. Resultados de un experimento para demostrar que la duplicación en cromosomas eucariotas se inicia en muchos puntos a lo largo del DNA. Las células se incubaron en ^3H -timidina durante un breve periodo antes de la preparación de fibras de DNA para autorradiografía. Las líneas de granos plateados negros indican sitios donde se incorpora el DNA radiactivo precursor durante el periodo de marcado. Es evidente que la síntesis ocurre en sitios separados a lo largo de la misma molécula de DNA. Como se indica en el dibujo de líneas acompañante, el inicio da lugar en el centro de cada sitio de incorporación de la timidina formando dos biturcaciones de duplicación que se mueven separándose hasta encontrar una bifurcación vecina. (Micrografía cortesía de Joel Huberman.)

ticular de un cromosoma sufre duplicación en un tipo particular de célula está programado y es predecible. La secuencia de duplicación de una región del cromosoma puede estar gobernada principalmente por su estado de compactación: cuanto más firmemente compactado, más tardía será la etapa en la cual será duplicado. Las regiones más altamente compactadas del cromosoma constan de heterocromatina (pág. 498), que es el último DNA que se duplica. Esta diferencia en el momento de la duplicación no se debe a secuencias DNA, puesto que el cromosoma X inactivo, heterocromatizado en las células de los mamíferos femeninos (página 500) se duplica muy tardíamente en la fase S, en tanto que el cromosoma X eucromático activo se duplica en etapas más tempranas. Puesto que es indispensable que cada porción del genoma sólo se duplique una vez durante cada ciclo, debe haber algún mecanismo para evitar el reinicio de la duplicación en un sitio que ya ha sido duplicado.

En los últimos 10 años se han efectuado numerosas investigaciones para dilucidar el mecanismo mediante el cual se inicia la duplicación. El avance más significativo en este campo se logró con células de levadura, puesto que se puede eliminar el origen de la duplicación del cromosoma de levadura e introducir en otras moléculas de DNA, confiriéndoles la capacidad de duplicarse dentro de una célula de levadura o al ser incubadas en extractos celulares que contengan las proteínas necesarias para la duplicación. Puesto que estas secuencias tienen la capacidad de promover la duplicación del DNA que las contiene, se les conoce como *secuencias duplicantes autónomas (SDA)*.

Los cromosomas de una célula de levadura contienen aproximadamente 400 orígenes de duplicación (o SDA) dispersos a través de su DNA. Las SDA aisladas y analizadas comparten variados elementos. El elemento central de una SDA consta de 11 pares de bases y funciona como sitio de enlace específico para un complejo multiproteínico esencial denominado *complejo de reconocimiento del origen (CRO)*. Cuando se provoca una mutación en la SDA de modo que

no pueda enlazarse al CRO, no puede ocurrir el inicio de la duplicación. Justo adyacente al sitio de enlace al CRO se encuentran secuencias en ambos lados en las cuales el DNA dúplex muestra menor estabilidad y constituye un sitio donde la doble hélice es fácil de desenrollar (fig. 13-23). Se cree que el inicio de la duplicación se desencadena por enlace de otro componente de la multiproteína del CRO que ya reside en el origen. Este enlace puede estimular el desenrollamiento local del DNA en las secuencias adyacentes. Igual que en las bacterias, el desenrollamiento del DNA en cada origen tal vez constituya la etapa previa al subsecuente enlace de todas las proteínas necesarias para establecer un par de bifurcaciones de duplicación activas.

La determinación de la naturaleza de los orígenes de la duplicación es más difícil de estudiar en células de mamíferos que en levaduras. Parte del problema reside en que al estudiar *in vitro* la actividad de las plantillas del DNA desnudo purificado utilizando extractos celulares de células de mamíferos, prácticamente todos son adecuados para la duplicación. Estos estudios sugieren que el DNA de mamíferos quizá no posea sitios específicos en donde se inicie la duplicación. Sin embargo, estudios de duplicación en cro-

mosomas intactos *in vivo* sugieren que la duplicación se inicia en sitios específicos a lo largo del DNA y no por selección al azar, como ocurre *in vitro*. Al parecer, la molécula de DNA contiene muchos sitios donde se *puede* iniciar la duplicación DNA, pero los efectos de la organización de la cromatina y de la posición del nucleosoma suprimen el inicio en la mayor parte de estos sitios, en tanto que lo promueven en sitios específicos que sirven como origen de la duplicación.

Recientemente se precisó un sitio donde se inicia la duplicación bidireccional en el grupo de genes de globina β , como se muestra en la figura 13-24. Cuando se corra esta secuencia específica, como ocurre en pacientes que sufren de una deficiencia determinada de la hemoglobina, conocida como síndrome de la hemoglobina de Lepore, el DNA de esta parte del cromosoma se duplica mediante una bifurcación de duplicación que se desplaza al interior de la región de un origen no identificado residente fuera del grupo de genes de globina β (fig. 13-24, abajo). Por lo tanto, el patrón de uso del origen es flexible y la eliminación de un origen no estimula el inicio en una nueva secuencia de origen. En vez de ello, la célula toma ventaja de la presencia de un origen a distancia.

Duplicación y estructura del núcleo

Datos crecientes sugieren que la matriz nuclear (pág. 506) desempeña un papel importante en el proceso de duplicación, igual que en los sucesos de transcripción. Cuando se administran a las células pulsos breves de precursores radiactivos de DNA, casi 80% de la radiactividad incorporada se encuentra en la matriz nuclear. Este dato sugiere que el mecanismo de duplicación ocurre en estrecha relación con la matriz nuclear. Si en lugar de fijar las células inmediatamente después del pulso se les permite incorporar precursores de DNA *no marcado* durante una hora, aproximadamente, antes de la fijación, la mayor parte de la radiactividad se puede seguir desde la matriz hasta las asas

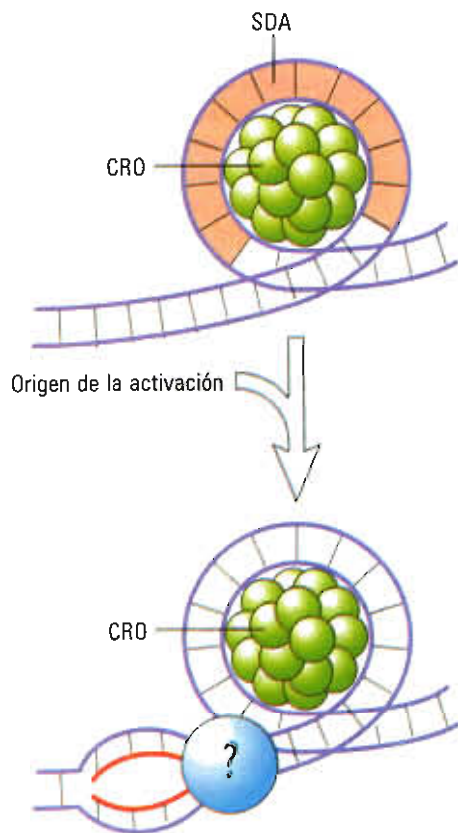


FIGURA 13-23. Activación del origen de duplicación en una levadura. Las pruebas indican que un complejo de proteínas (CRO) reside en el origen de duplicación hasta ser activado por la adición de otro factor (representado por la partícula en azul). El enlace del factor al complejo preexistente provoca la separación de la cadena, que conduce al reclutamiento de las proteínas de duplicación necesario para ensamblar una bifurcación de duplicación activa.

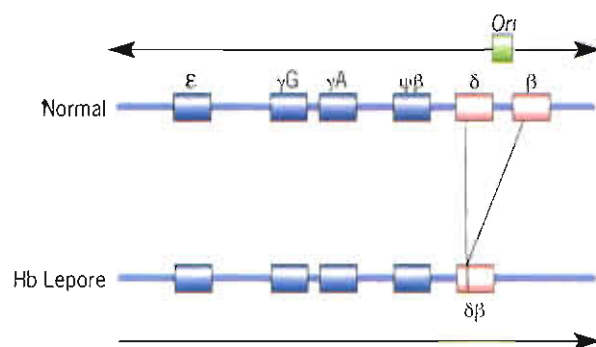


FIGURA 13-24. Localización de un origen de duplicación dentro del locus del gen de globina β humano. La duplicación se inicia en el sitio indicado en la parte de arriba y avanza hacia afuera en ambas direcciones. Si este origen de duplicación se borra, como en el caso de personas con un tipo particular de β -talasemia quienes producen una hemoglobina anormal (Hb *Le* Lepore), los genes de globina β se duplican en bifurcaciones que se originan por fuera del locus. (Según J.F.X. Diffley, C. Orr. Opin. Cell Biol. 6:370, 1994.)

de DNA circunvecinas. Este último dato sugiere que el DNA duplicante se mueve como cinturón transportador a través de un aparato de duplicación inmovilizado (fig. 13-25).

Estudios subsecuentes sugieren que las bifurcaciones de duplicación activas en cualquier momento dado no se distribuyen al azar dentro del núcleo celular, sino que se localizan en unos 50 a 250 sitios, llamados **focos de duplicación** (fig. 13-26, *a*). Se estima que cada uno de los brillantes puntos rojos indicados en la figura 13-26, *a*, contiene cerca de 40 bifurcaciones de duplicación incorporando nucleótidos simultáneamente en cadenas de DNA. Además de contener las proteínas y enzimas necesarias para la síntesis de DNA, estos focos son sitios donde se concentra la enzima metiltransferasa (fig. 13-26, *b*), encargada de la metilación del DNA inmediatamente después de ser sintetizado (pág. 568).

Estructura y duplicación de la cromatina

En tanto el cromosoma de las células procariotas consta principalmente de una molécula desnuda de DNA, los cromosomas de las células eucariotas contienen DNA que forma un complejo firmemente apretado con disposiciones regulares de proteínas. De igual manera que el mecanismo de transcripción puede atravesar una región del DNA íntimamente vinculada con partículas centrales de histona, de igual manera lo hace el mecanismo de duplicación. Igual que en la transcripción (pág. 526), el acceso al DNA durante la duplicación se puede lograr mediante la abertura

o desplegamiento de las partículas centrales del nucleosoma. En cualquier caso, la presencia de un centro de histona durante la duplicación plantea la pregunta acerca de la distribución de estas partículas a las hijas dúplex. El examen de una molécula de DNA duplicante con el microscopio electrónico revela partículas parecidas a nucleosomas en ambas hijas dúplex muy cerca de la bifurcación de duplicación (fig. 13-27, *a*), lo que sugiere que el ensamblado del DNA para formar nucleosomas es un acontecimiento muy rápido. Un gran número de estudios concuerdan en el dato de que las histonas recién sintetizadas y las histonas preexistentes no se mezclan en la formación de nucleosomas durante la duplicación. Más bien, los octámeros de histona presentes antes de la duplicación permanecen intactos y se pasan a las hijas dúplex, en tanto que las histonas recién sintetizadas se ensamblan en partículas centrales totalmente "nuevas". La manera como se segregan estos octámeros nuevos y viejos de histona es tema de gran controversia. Las pruebas actuales sugieren que conforme la bifurcación de duplicación pasa a través del centro de un nucleosoma, el octámero de histona que constituye dicho centro *pasa al azar* a una hija dúplex, y un nuevo octámero de histona se ensambla en el otro brazo de la bifurcación. Por lo tanto, las partículas centrales nuevas y viejas se distribuyen al azar entre las dos hijas dúplex (fig. 13-27, *b*). Es más confusa la manera en la cual las hijas dúplex adquieren poblaciones similares de proteínas cromosómicas *no* de histona.

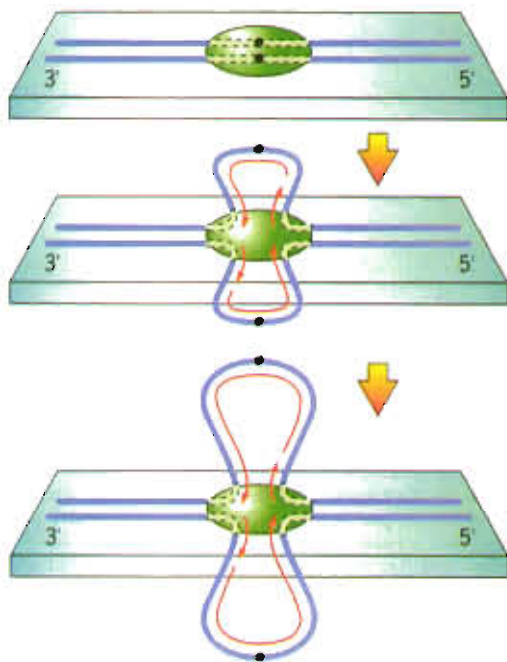


FIGURA 13-25. Participación de la matriz nuclear en la duplicación del DNA. Diagrama que muestra cómo se unen a la subestructura nuclear los orígenes de la duplicación y las bifurcaciones de duplicación bidireccional. Los orígenes de la duplicación están indicados por los puntos, y las flechas indican la dirección del alargamiento de las cadenas en crecimiento.

13-2 Reparación del DNA

La vida sobre la tierra está sujeta a muchas fuerzas destructivas que se originan en los medios interno y externo del organismo. En todas las moléculas dentro de la célula, el DNA se encuentra en las condiciones más precarias. Por un lado, es indispensable que la información genética permanezca prácticamente invariable conforme pasa de una célula a otra y de un individuo a otro. Por otra parte, el DNA es una de las moléculas de la célula más susceptible a daño ambiental. Cuando el esqueleto de una molécula de DNA es golpeado por radiación ionizante con frecuencia se rompe; cuando se le somete a la acción de compuestos químicos comunes, algunos producidos por el propio metabolismo de la célula, las bases de una molécula de DNA se pueden alterar de manera estructural; cuando se exponen a la radiación ultravioleta, las pirimidinas adyacentes a la cadena de DNA muestran tendencia a interactuar entre sí para formar un complejo covalente, o sea, un dímero (fig. 13-28). Incluso la absorción de energía térmica por el DNA de un ave o mamífero de sangre caliente es suficiente para separar las bases adenina y guanina de su fijación a los azúcares de su esqueleto carbonado del DNA. La magnitud de estas alteraciones espontáneas (*lesiones*) se puede apreciar del dato estimado de que cada célula de mamífero de sangre caliente pierde varios miles de bases al día! Cuando estas lesiones no se reparan, se produce una lesión permanente, o mutación, en el DNA. Si la mutación ocurre en una célula que se encuentra en camino de convertirse en gameto, la alteración genética puede pasar a la generación siguiente. Las mutaciones también tienen efectos sobre células no re-

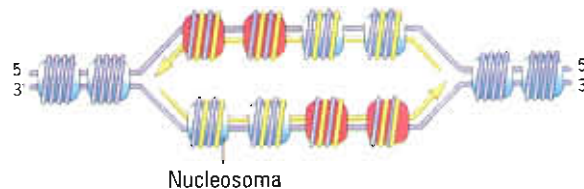
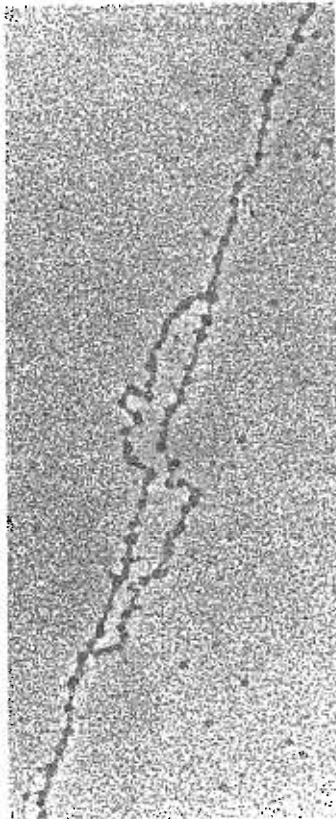


(a)



(b)

FIGURA 13-26. Demostración de que la actividad de duplicación no ocurre al azar en todo el núcleo, sino está confinada a un número relativamente pequeño de sitios distintos. *a)* Antes de iniciar la síntesis de DNA al principio de la fase S, se requieren varios factores para iniciar la duplicación que son ensamblados en sitios discretos dentro del núcleo, formando centros de preduplicación. Estos sitios aparecen como objetos discretos en rojo en la micrografía, que fue teñida con un anticuerpo fluorescente contra una proteína llamada factor A de duplicación (FAD) necesario para iniciar la duplicación. *b)* El patrón de metilación de los residuos de citidina en el DNA de la cadena progenitora se conserva en la cadena hija luego de la duplicación por acción de una DNA metiltransferasa. Los puntos brillantes en este núcleo muestran los sitios en la enzima durante la fase S, periodo del ciclo celular correspondiente a la síntesis de DNA. Se observa que la enzima se concentra dentro de los sitios discretos, que constituyen los focos de duplicación donde tiene lugar la síntesis de DNA. (*a:* Según Yasuhisa Adachi y Ulrich K. Laemmli, EMBO J. vol. 13, cover of no. 17, 1994, con permiso de Oxford University Press; *b:* cortesía de Andrea W. Page y Timothy H. Bestor.)



(b)

FIGURA 13-27. Distribución de los complejos centrales de histona entre las cadenas hijas después de la duplicación. *a)* Micrografía electrónica de la cromatina aislada del núcleo de un embrión de *Drosophila* en rápido desdoblamiento, que muestra un par de bifurcaciones de duplicación que se alejan entre sí en direcciones opuestas. Entre las dos bifurcaciones se pueden observar regiones de DNA recientemente duplicado ya cubiertas por partículas centrales nucleosómicas con igual densidad aproximada de las cadenas progenitoras que todavía no sufren duplicación. *b)* Diagrama de la disposición de los nucleosomas después de la duplicación del DNA. Las partículas centrales presentes antes de la duplicación se indican en azul, en tanto que las partículas centrales compuestas de histonas nuevas se indican en rojo. Los dos tipos de partículas se distribuyen al azar a lo largo de las cadenas hijas. (*a:* Cortesía de Steven L. McKnight y Oscar L. Miller, Jr.; *b:* según M.L. DePamphilis, Curr. Opin. Cell Biol. 5:435, 1993.)

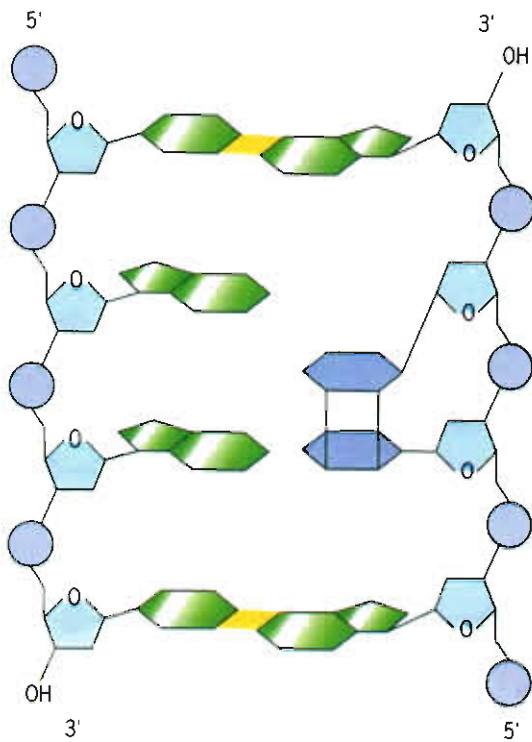


FIGURA 13-28. Dímero de pirimidina formado en un DNA dúplex luego de radiación UV.

productivas; pueden impedir la transcripción y la duplicación, conducir a la transformación maligna de una célula, y acelerar el proceso de envejecimiento de un organismo.

Considerando las drásticas consecuencias de las alteraciones en las moléculas de DNA y la elevada frecuencia con que ocurren, es indispensable que las células posean algún mecanismo para reparar los daños genéticos. En realidad, los biólogos han descubierto que las células tienen varios sistemas de reparación al parecer capaces de corregir casi todo tipo de daño al cual la molécula de DNA pueda ser vulnerable. Se estima que en 1 000 salvamentos efectuados por el sistema de reparación de la célula, el daño es menor que el cambio de una sola base. La existencia de estos sistemas suministra un elegante ejemplo de los mecanismos que han evolucionado para el mantenimiento homeostático del estado viviente.

Tanto las células procariotas como las eucariotas poseen varias enzimas que vigilan el DNA "en búsqueda" de alteraciones y deformaciones que dichas enzimas pueden reconocer y reparar. En algunos casos, el daño se puede solucionar directamente; por ejemplo, hay una enzima que usa la energía de la luz solar para romper el enlace que mantiene juntas a dos pirimidinas en un dímero de pirimidinas, y por lo tanto retorna la molécula a su condición original. Sin embargo, la mayor parte de los sistemas de reparación requieren que la sección dañada del DNA sea *escindida*, o sea, eliminada selectivamente. Una de las grandes virtudes del DNA dúplex consiste en el hecho de que cada cadena contiene la información necesaria para construir a

su pareja. Por consiguiente, si se eliminan uno o más nucleótidos de una cadena, la cadena complementaria puede seguir como plantilla para reconstruir el dúplex. Puesto que la reparación del DNA implica síntesis de DNA, es fácil saber si está ocurriendo por la incorporación de ^3H -timidina en momentos en que la célula no participa de alguna manera en la duplicación de DNA (véase fig. VE 13-4, al final del capítulo). Como veremos en el siguiente análisis, la duplicación del DNA y la reparación del mismo tienen muchas características en común, y por lo tanto no es sorprendente que compartan muchas de las "partes y servicios".

Reparación por excisión de nucleótidos

Los sistemas de reparación por excisión de nucleótidos operan eliminando una pequeña sección de la cadena de DNA que contiene ciertos tipos de lesiones en masa, como los dímeros de pirimidina o nucleótidos a los cuales se han fijado ciertos grupos químicos (paso 1, fig. 13-29). El proceso de reparación se inicia con la acción de un par de endonucleasas que practican incisiones en el esqueleto de la cadena alterada a cada lado de la lesión (paso 2). El oligonucleótido dañado situado entre los cortes queda entonces

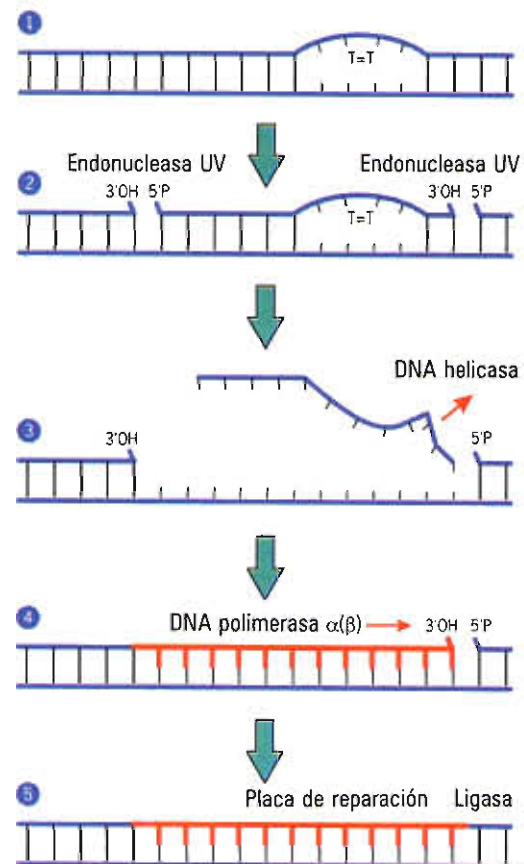


FIGURA 13-29. Reparación con excisión de nucleótidos. Los pasos se describen en el texto.

contenido en el dúplex únicamente por puentes de hidrógeno a las bases de la otra cadena. Recordemos que durante la duplicación del DNA los puentes de hidrógeno que mantienen junto al dúplex son separados por una DNA helicasa. También se cree que una DNA helicasa es la encargada de desmontar el oligonucleótido dañado para separarlo de la cadena complementaria intacta durante la reparación por excisión (paso 3, fig. 13-29). Una vez practicada la excisión, la hendidura se llena mediante la acción de una DNA polimerasa (paso 4) y la cadena se sella por la DNA ligasa (paso 5).

La reparación por excisión de nucleótido consta de dos vías:

1. Una vía "preferencial" para reparar de preferencia la plantilla de la cadena de genes que se transcriben activamente. Se cree que la reparación de la cadena de la plantilla ocurre conforme se transcribe el DNA empleando algunos de los elementos que componen el mecanismo de transcripción (pág. 449). Esta vía de reparación preferencial garantiza que los genes de mayor importancia para la célula, que son los genes que la célula transcribe activamente, reciban la más alta prioridad en la "lista de reparaciones".
2. Una vía menos eficiente, más lenta, que corrige las cadenas DNA en el resto del genoma.

Reparación por excisión de bases

Tanto en células eucariotas como procariotas opera un sistema de reparación por excisión de manera totalmente independiente para eliminar algunos de los nucleótidos alterados y que producen menos deformación de la doble hélice (paso 1, fig. 13-30). En este mecanismo alterno de reparación por excisión, una *DNA glucosilasa* inicia la respuesta reconociendo la alteración y eliminando la base por desdoblamiento del enlace glucosídico que sostiene dicha base al fragmento del azúcar (paso 2, fig. 13-30). Se han identificado algunos tipos diferentes de DNA glucosilasas, cada una más o menos específica para un tipo particular de base alterada, incluyendo uracilo (que se forma por el desdoblamiento hidrolítico del grupo amino de la citosina), 8-hidroxi-guanina (que resulta del daño causado por radicales libres de oxígeno, pág. 34), y 3-metiladenina (causada por agentes alquilantes). Una vez extrae la purina o la pirimidina alterada, el fosfato de desoxirribosa "decapitado" que permanece en el sitio se elimina por acción de una endonucleasa, una fosfodiesterasa amplía la abertura y luego una DNA polimerasa la llena (pasos 3 a 5, fig. 13-30). Por último, la cadena se sella mediante acción de una DNA ligasa (paso 6). El hecho de que el uracilo se pueda formar a partir de citosina quizá sea la razón de que la selección natural favoreció el empleo de timina como base en el DNA en vez de uracilo, el cual al parecer se encontraba en el RNA que previamente había servido como material genético. Si se hubiera retenido el uracilo como una de las bases del DNA, podría causar dificultad a los sistemas de reparación para distinguir entre un uracilo "perteneciente" a un sitio particular y otro que se hubiera formado por alteración de

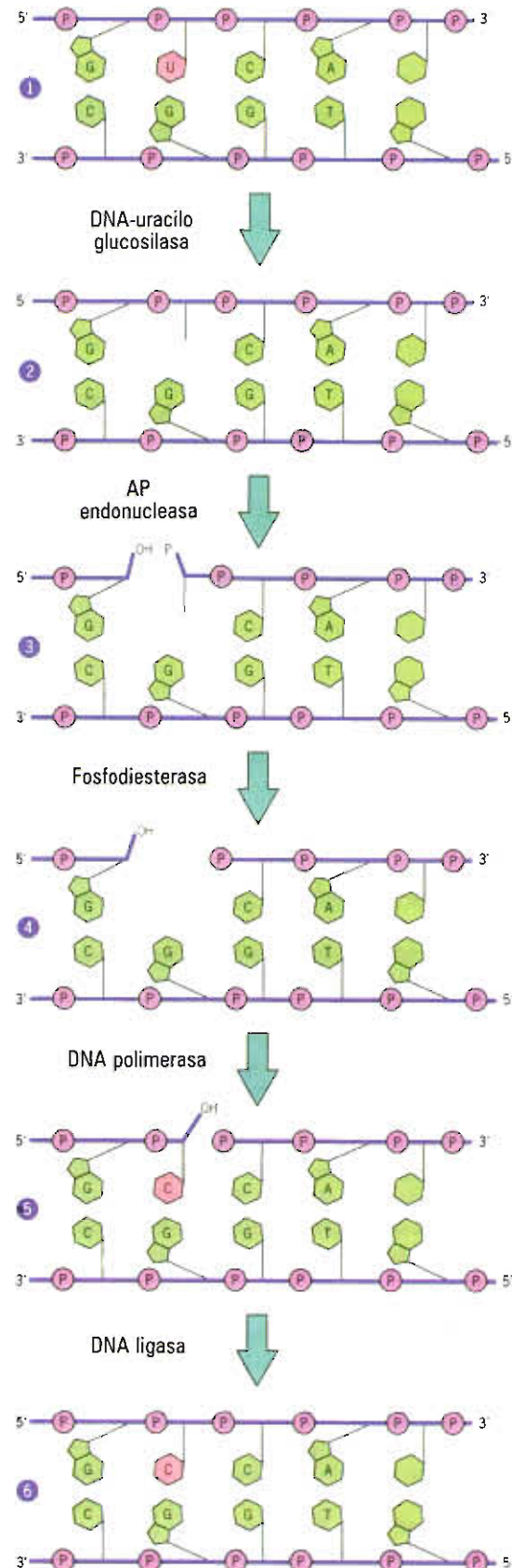


FIGURA 13-30. Reparación por excisión de bases. Los pasos se describen en el texto.

la citosina. Es interesante saber que la enzima que elimina el uracilo del DNA (uracilo-DNA glucosilasa) es una de las proteínas más conservadas entre *E. coli* y seres humanos, compartiendo 56% de la identidad en la secuencia de aminoácidos.

Reparación de las desigualdades

En una sección anterior (pág. 562) se hizo notar que las células pueden eliminar bases no coincidentes incorporadas por la DNA polimerasa durante la duplicación las cuales escaparon de la corrección de pruebas de la enzima endonucleasa. La desigualdad de un par de bases provoca deformación de la geometría de la doble hélice, que puede ser reconocida por una enzima de reparación. ¿Pero cómo puede la enzima reconocer el nucleótido incorrecto en el par no coincidente? Si tuviera que eliminar uno de los nucleótidos al azar, la selección sería equivocada en 50% de los casos generando una mutación permanente en el sitio. Por lo tanto, para reparar la desigualdad luego que la DNA polimerasa pasa por el sitio, es indispensable que el sistema de reparación pueda distinguir la cadena recién sintetizada, que contiene el nucleótido incorrecto, de la cadena

progenitora, que contiene el nucleótido correcto. En las bacterias, las dos cadenas se distinguen por la presencia o ausencia de grupos metilo. La cadena progenitora posee grupos metilo presentes en ciertos residuos de adenosina que no se añaden a la cadena recién sintetizada sino hasta cierto tiempo después de la duplicación. El sistema de reparación revisa el DNA antes de este paso de metilación; cuando reconoce desigualdad, la enzima siempre elimina y sustituye nucleótidos de la cadena no metilada, lo que garantiza que retorne el par de bases a su estado original. Puesto que en muchos eucariotes no hay metilación de DNA, se piensa que las células eucariotas deben emplear algún otro mecanismo para reparar las desigualdades.

La importancia de la reparación del DNA se puede apreciar examinando los efectos en el hombre que resultan de las deficiencias en la reparación de DNA, tema que analizaremos en *La perspectiva humana* acompañante. El estudio de estas enfermedades humanas ha suministrado una ventana a través de la cual se puede echar una mirada a la naturaleza de las proteínas implicadas en la reparación del DNA. Estos estudios, que se describen en la *Vía experimental*, al final del capítulo, constituyen una de las áreas más estimulantes de los estudios actuales en Biología molecular.

LA PERSPECTIVA HUMANA

Deficiencias en la reparación por excisión de nucleótidos en el ser humano

Debemos nuestra existencia a luz del sol que suministra la energía capturada durante la fotosíntesis. Pero el sol también emite una corriente continua de rayos ultravioleta que envejece y provoca mutaciones a la células de nuestra piel. Los efectos nocivos del sol se ilustran de manera más notable por una rara enfermedad genética recesiva, el *xeroderma pigmentosum* (XP). Como se analiza con mayor detalle en *La vía experimental*, las víctimas de XP poseen un sistema de reparación deficiente incapaz de eliminar los segmentos de DNA dañados por la radiación ultravioleta. Como resultado, las personas que padecen XP son sumamente sensibles a la luz del sol; incluso la exposición muy limitada a los rayos directos del sol pueden provocar la aparición

de un gran número de manchas pigmentadas de color oscuro sobre las regiones expuestas del cuerpo (fig. PH 13-1) y un riesgo mucho mayor de desarrollar cáncer cutáneo desfigurante mortal. Cerca de 20% de los pacientes con XP también presentan degeneración neurológica y retraso mental.

La XP no es la única enfermedad genética caracterizada por deficiencia del sistema de reparación por excisión. El síndrome de Cockayne (SC) es un trastorno hereditario caracterizado por sensibilidad a la luz, disfunción neurológica debida a desmielinización de las neuronas y varias anomalías del desarrollo, pero con incremento escaso o ausente de la probabilidad de padecer cáncer. Las células de las personas con SC tienen deficiencias en la vía prefe-

rencial para reparar DNA de transcripción activa (pág. 568), pero el resto del genoma se repara a una tasa normal, que al parecer es la razón por la cual estos individuos no están sujetos a mayor probabilidad de cáncer cutáneo. Aunque el perfil clínico de las dos enfermedades es muy diferente, ambas parecen ser consecuencia de defectos en el mismo gen. Las células de ciertos pacientes con XP y de ciertos pacientes con SC se pueden corregir mediante la introducción del mismo gen clonado. ¿Cómo se pueden producir dos enfermedades totalmente diferentes a partir de la deficiencia en el mismo gen? Una probable explicación es que en las dos enfermedades se afectan partes diferentes del polipéptido, y que estas distintas partes se encargan de diver-



FIGURA PH 13-1. En este niño con xeroderma pigmentosum son evidentes las regiones pigmentadas de color oscuro en la piel. El área de la piel situada debajo del mentón, protegida del sol, está relativamente desprovista de lesiones. (Ken Greer/Visuals Unlimited.)

sas actividades. Por ejemplo, un dominio del polipéptido debiera ser particularmente importante durante la transcripción, y por lo tanto un defecto en este gen sería la causa del fracaso de la expresión de ciertos genes. Este fracaso, a su vez, produciría las consecuencias específicas, como desarrollo anormal del sistema nervioso observa-

do en personas con síndrome de Cockayne. Por lo contrario, otro dominio del polipéptido podría ser particularmente importante en la reparación del DNA y las mutaciones de esta porción del gen causarían la elevada frecuencia de cáncer en personas con xeroderma pigmentosum.

Las víctimas de xeroderma pigmentosum no son los únicos individuos que deben preocuparse acerca de la exposición al sol. Incluso en células de la piel cuyo sistema de reparación funciona a niveles óptimos, cierta fracción de las lesiones no son escindidas ni sustituidas. Las alteraciones en el DNA conducen a mutaciones que pueden provocar malignización de las células (cap. 16). Por lo tanto, una de las consecuencias del fracaso para corregir el daño inducido por rayos UV es el riesgo de cáncer cutáneo. Consideremos las siguientes estadísticas. En Estados Unidos, cada año más de 600 000 personas desarrollan una de las tres formas de cáncer cutáneo, y la mayor parte de estos casos se atribuyen a exposición excesiva a los rayos ultravioleta del sol. Por fortuna, las dos formas más comunes de cáncer cutáneo, o sea carcinoma de células basales y carcinoma de células escamosas, raras veces se propagan a otras partes del cuerpo y en general se pueden escindir en el consultorio médico. Ambos tipos de cáncer se originan a partir de las células de la piel.

Sin embargo, el tercer tipo de cáncer cutáneo, el melanoma maligno, es potencialmente mortal. A diferencia de

los otros, el melanoma se desarrolla a partir de las células pigmentadas de la piel. Se puede originar en un lunar no maligno ya existente, o puede aparecer en un sitio donde previamente no había lunar alguno. El número de casos de melanoma diagnosticado en Estados Unidos está creciendo a una tasa alarmante de 4% anual, debido al incremento en los últimos decenios de la cantidad de tiempo que las personas permanecen al sol. Muchos científicos predicen que la tasa de melanomas se elevará aun con mayor rapidez en lo futuro si la capa de ozono que absorbe la radiación ultravioleta de la atmósfera continúa deteriorándose.

Los individuos de piel clara son particularmente susceptibles a desarrollar melanoma, igual que aquellos con parientes consanguíneos que han padecido la enfermedad o quienes viven en regiones muy soleadas. Por ejemplo, la tasa más elevada de melanoma se observa en Australia, que tiene un clima soleado tropical y está poblada principalmente por personas de piel blanca descendientes del norte de Europa. De manera similar, en Estados Unidos la frecuencia de melanoma en Arizona es el doble a la observada en Michigan. Pruebas crecientes sugieren que uno de los mayores factores de riesgo para desarrollar melanoma en la edad adulta es la ocurrencia de quemaduras solares graves durante la infancia o la adolescencia. Por lo tanto, evidentemente es importante prevenir dichas quemaduras en los niños.

LA VIA EXPERIMENTAL

Papel de las deficiencias en la reparación por excisión de nucleótidos en el ser humano en la investigación para reparar el DNA

En 1968, James Cleaver, de la Universidad de California, hizo un descubrimiento que abrió un nuevo campo en Biología molecular y Genética humana. Se sabía que personas afectadas de una rara enfermedad hereditaria, el xeroderma pigmentosum (XP), eran sumamente sensibles a la exposición a la luz solar (analizado, además, en *La perspectiva humana*). Cleaver había estado estudiando la capacidad de células cultivadas de mamífero para efectuar reparación del DNA. Previamente se había demostrado que las bacterias con mayor sensibilidad a la radiación ultravioleta eran portadoras de mutaciones en uno de los genes requeridos para la reparación del DNA. Cleaver se preguntó si el xeroderma pigmentosum podía ser causado por un tipo similar de mutación en el genoma humano. Para probar esta posibilidad, se tomaron biopsias de piel de tres pacientes con XP y de un sujeto normal saludable, los tejidos se colocaron en cultivo y se aislaron fibroblastos de cada una de las muestras de piel. A continuación se determinó la capacidad de los fibroblastos de cada una de estas fuentes para reparar daños al DNA producidos por radiación ultravioleta.¹

Como se estudió en la página 568, para eliminar dímeros de pirimidina de una cadena de DNA se requieren endonucleasas que corten la cadena y polimerasas para rellenar la abertura. Este último proceso se denomina reparación por duplicación y se puede probar midiendo la incorporación de timidina marcada con isótopos radiactivos en las células que no participan en la duplicación del DNA durante la fase S. En una serie de experimentos, Cleaver irradió cultivos de fibroblastos con varias dosis de luz ultravioleta, marcó las células con ³H-timidina durante tres horas y luego las fijó y procesó para

autorradiografía. El porcentaje de células marcadas en cada uno de los cuatro cultivos se muestra en el cuadro VE 13-1. Observó que todas las células normales sometidas a radiación UV participan en la reparación por duplicación, pero sólo una cuarta parte de las células de personas con XP presentaron radiactividad muy leve, no mayor que las células XP de los cultivos testigo no irradiados (cuadro VE 13-1, columna izquierda). Las cuentas de granos plateados situados sobre los núcleos de las células marcadas indicaron que aun las células XP marcadas contienen una concentración mucho menor de timidina incorporada en comparación con las células normales (fig. VE 13-1). Estos resultados indican que la reparación por duplicación en fibroblastos de personas con XP puede estar completamente ausente u ocurrir a un nivel mucho menor en comparación con células de individuos saludables.

Los estudios de los mecanismos de reparación del DNA en bacterias revelan que la reparación del DNA dañado por UV requiere la actividad de diferentes enzimas para excindir la lesión, reparar la cadena de DNA y ligar el DNA sustituto a la porción no reparada de la cadena. A raíz de los estudios iniciales de Cleaver sobre células XP, varios laboratorios comenzaron a analizar las deficiencias específicas a nivel molecular, lo que generó el fenotipo XP. Uno de los primeros estudios fue realizado por R.B. Setlow y sus colegas, en Oak Ridge National Laboratory.² En una serie de experimentos, estos investigadores compararon la capacidad de células normales y de células derivadas de XP para excindir dímeros de pirimidina, que es el primer paso en la vía de la reparación (fig. 13-29). Se incubaron dos tipos de células con ³H-timidina durante 24

CUADRO VE 13-1. Índice de marcado de fibroblastos de piel humana incubados durante tres horas en timidina-³H luego de varias dosis de luz ultravioleta

	Testigo	100 erg/mm ²	500 erg/mm ²	1 000 erg/mm ²
Normal	41.2%	100 %	100 %	100 %
Xeroderma pigmentosum (5 años de edad, sexo masculino)	24.2%	25.3%	24.6%	27.4 %
Xeroderma pigmentosum (9 años de edad, sexo femenino)	19.0%	23.2%	21.0%	15.0%
Xeroderma pigmentosum (29 años de edad, sexo masculino)	22.2%	28.9%	29.2%	26.0%

FUENTE: Reimpreso con permiso de J.E. Cleaver, *Nature* 218:655, 1968. Copyright 1968, Macmillan Magazines Ltd.

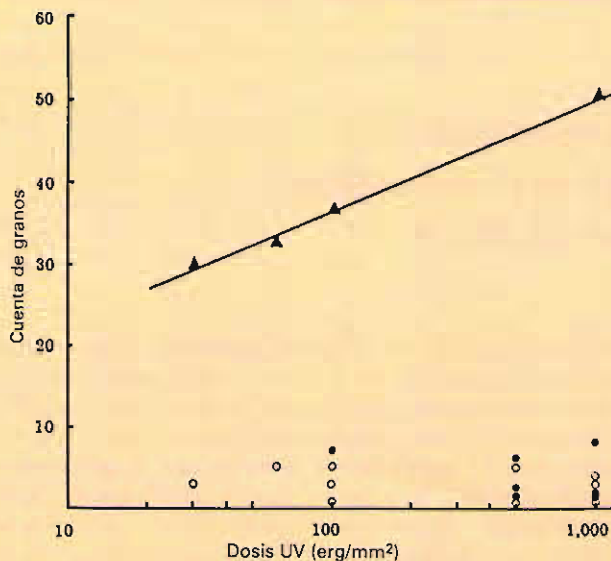


FIGURA VE 13-1. Número de granos plateados contados sobre los núcleos de células que no participan en la duplicación premitótica (fase S). Las células se expusieron a diferentes dosis de radiación UV, a continuación se incubaron durante tres horas en ^3H -timidina, se lavaron para liberarlas del isótopo no incorporado y se prepararon para autorradiografía. Los triángulos macizos son cuentas sobre los núcleos de las células normales de la piel, los círculos cerrados son cuentas sobre los núcleos de células XP, y los círculos abiertos son el número basal de granos plateados sobre una región de la laminilla equivalente a un núcleo celular. La incorporación de ^3H -timidina por las células XP no es significativamente diferente del nivel basal, lo que explica la virtual ausencia de la síntesis de DNA para reparación. (Reimpreso con permiso de J.E. Cleaver, *Nature* 218:655, 1968; copyright 1968 Macmillan Magazines Limited.)

horas, de modo que su DNA fuera marcado con radiactividad. Luego del periodo de marcado, las células se lavaron para liberar las del isótopo, se añadió medio no marcado a los cultivos, y las células se irradiaron a través del fondo de cajas de Petri con luz ultravioleta. Luego del periodo de irradiación se extrajeron muestras de los dos grupos de células y se determinó la proporción de timina marcada presente como dímeros de pirimidina que contienen timina mediante hidrólisis ácida del DNA seguida por cromatografía en papel. Los resultados de los experimentos se muestran en la figura VE 13-2. En tanto que las células normales pudieron eliminar 50 a 70% de los dímeros en un periodo de 24 horas, las células XP mostraron excisión escasa o ausente. La tasa inicial promedio de excisión en las células XP era menor a la décima parte de la observada en las células testigo.

En una segunda parte del estudio, los investigadores intentaron determinar el número relativo de roturas en la cadena simple del DNA de células normales y de células XP sometidas a radiación UV. La presencia de roturas en la cadena simple demuestra la actividad de endonucleasa requerida para eliminar un dímero de pirimidina en el primer plazo de la reparación con excisión del nucleótido (fig. 13-29). Para investigar las roturas en la cadena simple, se extrajo DNA de células

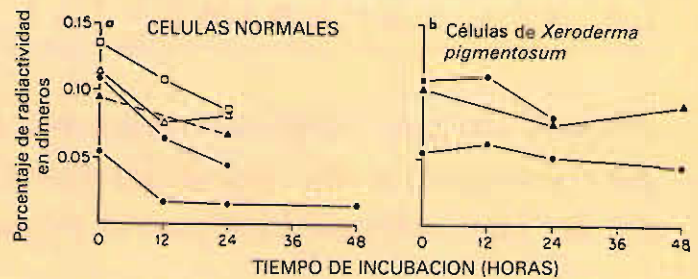


FIGURA VE 13-2. Cuando las células normales se someten a radiación UV (curvas de la izquierda) se forman dímeros que contienen timina en el DNA, pero con el tiempo desaparecen según lo explica el descenso de cada una de las curvas, que representan experimentos separados con diferentes exposiciones a UV. En contraste, los dímeros que contienen timina formados en el DNA de células XP luego de exposición UV similar, no desaparecen con el tiempo (curvas de la derecha). Las curvas individuales representan experimentos separados. (Según R.B. Setlow y cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 64:1038, 1969.)

irradiadas, se extendió en una capa sobre un gradiente de sacarosa alcalina y se sometió a ultracentrifugación durante 90 minutos a 30 000 rpm. Los fragmentos más grandes de DNA (con mayor coeficiente de sedimentación) se desplazan más rápido durante la centrifugación, comparados con fragmentos más pequeños y, como resultado, se localizan más cerca del fondo del tubo al concluir el periodo de sedimentación. La alcalinidad de los gradientes provoca la separación de las dos cadenas de cada DNA dúplex, y por lo tanto las cadenas que presentan roturas en su longitud se comportan como moléculas más pequeñas en los gradientes en comparación con las que carecen de dichas roturas.

Los resultados de este tipo de experimentos efectuados sobre células normales se muestran en la figura VE 13-3. Diez horas después de la irradiación, la constante de sedimentación de DNA de células irradiadas es considerablemente menor que la de las células no irradiadas, lo que indica la presencia de roturas en las cadenas simples. Cerca de las 24 horas, el DNA de las células irradiadas y no irradiadas muestra un perfil similar de sedimentación indicando que la rotura de las cadenas simples se ha reparado. Por lo contrario, el perfil de sedimentación del DNA extraído de células XP irradiadas permanece igual en todo momento después de la irradiación, lo que demuestra la ausencia de roturas en las cadenas simples del DNA. Estos resultados sugieren que las células XP carecen de endonucleasa funcional capaz de efectuar la incisión en la cadena de DNA que contiene un dímero de pirimidina.

La reparación por excisión de nucleótidos es un proceso complicado y de múltiples pasos y no hay razón para esperar que todos los pacientes con XP tengan presente el mismo gen defectuoso. En 1969 se desarrolló una manera relativamente sencilla de probar esta premisa utilizando la fusión celular.³ Como se ilustra en la figura 4-25, es una técnica en la cual se fusionan dos células de tipo diferente para producir una célula híbrida que contiene los cromosomas combinados de ambas células participantes. Consideremos lo que sería de esperar si

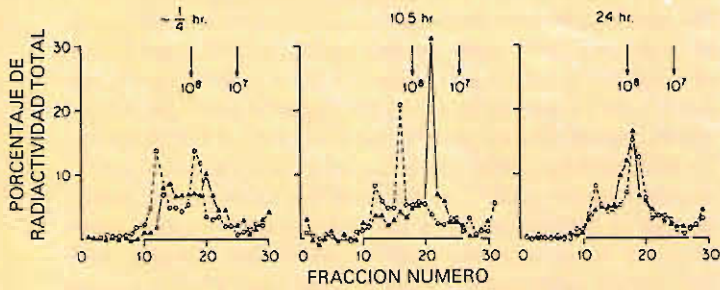


FIGURA VE 13-3. Patrones de sedimentación del DNA extraído de células normales que sirvieron como testigos no irradiados (círculos abiertos) o irradiados en el tiempo cero con 150 ergs/mm² de luz UV (triángulos cerrados). Las células crecieron durante los tiempos indicados antes de sedimentar el DNA a través de un gradiente de densidad en sacarosa alcalina (la alcalinidad garantiza que los sedimentos de DNA correspondan a cadenas sencillas). En el lado izquierdo de cada curva se muestra el sedimento del fondo de cada tubo de la centrifuga (que contiene las cadenas de mayor tamaño). La presencia de actividad para reparación del DNA está indicada por el pico de cadenas de DNA de menor tamaño a las 10.5 horas, lo que refleja la presencia de roturas en la cadena sencilla que acompaña al proceso de reparación. Este pico desaparece después que se une el DNA reparado a las cadenas no alteradas. Las flechas indican las posiciones esperadas del DNA de cadena única con pesos moleculares de 10⁷ y 10⁸, según se pudo estimar por experimentos separados de sedimentación de DNA marcado con ³H-timidina de un fago. (Según R.B. Setlow y cols. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 64:1039, 1969.)

se fusionaran dos células que contengan *diferentes* defectos genéticos. Puesto que la célula híbrida debe contener los alelos normales para ambas funciones genéticas, debe poseer un fenotipo normal. En otras palabras, los cromosomas de las dos células pueden complementarse entre sí puesto que los defectos se encuentran en genes separados. Por lo contrario, si las dos células participantes tienen defectos en genes iguales, entonces la célula híbrida carecerá de un gen normal para esta característica y mostrará el mismo defecto genético de ambas células participantes. La primera prueba de esta premisa se realizó utilizando dos cepas diploides masculinas humanas, cada una portadora de una mutación diferente vinculada al cromosoma X. Una cepa era incapaz de producir glucosa 6-fosfato deshidrogenasa funcional y la otra de producir hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa funcional. Las células híbridas resultantes mostraron que podían sintetizar productos normales de ambos genes, confirmando la capacidad de los cromosomas X de las dos células para complementarse entre sí.³

La primera vez que se usó la hibridación celular para probar la complementación intergénica en el *xeroderma pigmentosum* se efectuó en 1972 en el laboratorio de Dirk Bootsma, en la Universidad Erasmus de Holanda. Se sospechaba que el XP podía ser resultado de deficiencias en diferentes sitios del gen, puesto que no todas las personas con la enfermedad mostraban los mismos síntomas o gravedad de la enfermedad. Si diferentes personas con XP presentan mutaciones en diversos sitios del gen, entonces sería de esperar que alguno de los híbridos resultantes de la fusión de células de distintos pacientes posea un complemento íntegro del gen "normal", y por lo

tanto recupere su capacidad para reparar DNA. Este fue precisamente el resultado observado.⁴ Cuando se fusionaron células de varios pacientes con XP en diferentes combinaciones, algunos de los híbridos retuvieron su sensibilidad a UV indicando que ambas células contenían defectos en el mismo gen. Otros híbridos mostraron complementación genética, según pudo juzgarse por la escasa incorporación de ³H-timidina, revelada autorradiográficamente. En la figura VE 13-4 se muestra un ejemplo de este tipo de experimento, en el cual es evidente que la timidina se incorpora al DNA como parte de un proceso de reparación más bien que como parte de la duplicación normal que ocurre durante la fase S, puesto que el nivel de incorporación es varios órdenes de magnitud menor que el observado en la fase S de las células. Además, la escasa incorporación de este tipo de reparación nunca se observa en híbridos formados entre dos células de la misma cepa de XP (o sea, del mismo paciente), sino que sólo ocurre cuando las células fusionadas proceden de cepas diferentes.

En los siguientes años se efectuaron numerosos estudios para probar la capacidad de las células XP de diferentes pa-



FIGURA VE 13-4. Empleo de la fusión de células para demostrar que el XP puede ser por defectos en diferentes genes de distintos pacientes. Se marcaron fibroblastos de dos pacientes con XP por inclusión de esferitas de látex de diverso diámetro y luego fusionadas entre sí mediante la adición de un virus Sendai inactivado. A continuación el cultivo se sometió a irradiación UV y después se incubó en presencia de ³H-timidina. Mediante radiografías se vigiló la incorporación de los precursores marcados al DNA como resultado de la reparación por excisión de nucleótidos. El nivel de reparación del DNA en un núcleo se refleja en el número de granos plateados observados sobre dicho núcleo. La micrografía muestra tres células: una célula híbrida y dos células no fusionadas. La célula no fusionada del grupo XP-C contiene las esferitas de mayor tamaño y la célula no fusionada del grupo XP-G contiene las esferitas de menor tamaño. Una de dichas células no muestra capacidad para reparación del DNA y la otra muestra actividad muy limitada. La célula híbrida situada cerca del centro de la micrografía contiene dos núcleos, uno de cada paciente (según se indica por la presencia de ambos tipos de esferitas en el citoplasma). Los dos núcleos muestran granos plateados, lo que significa la capacidad de los genes de uno de los núcleos para suplir el defecto de los genes del otro núcleo. (Según Jan H.J. Hoeijmakers, Trends in Genetics 9:211, 1993.)

cientes para complementarse entre sí utilizando la prueba de fusión celular. El análisis de los híbridos formados a partir de un gran número de combinaciones sugiere que las células de los pacientes XP se pueden dividir en siete "grupos de complementación" diferentes conocidos como XP-A a XP-G.⁵ Siempre que se fusionaron dos células de diferentes grupos de complementación, los híbridos recuperaron su capacidad para efectuar reparación del DNA. Estos resultados sugieren que cuando menos siete genes diferentes codifican productos necesarios para reparar DNA dañado por UV, lo que refleja la complejidad del proceso.

Conforme prosiguieron los estudios en el hombre, otros investigadores pudieron aislar células de roedores sensibles a la luz UV y se asumió que mostraban deficiencias de reparación del DNA similares a las observadas en células aisladas de personas con XP.⁶ Estas estirpes de células de roedores demostraron ser valiosas como medio para aislar genes humanos implicados en la reparación con excisión de nucleótidos. Consideremos una célula de roedor que tiene la misma deficiencia que una persona incluida en uno de los grupos XP. Si esta célula captara un fragmento de DNA humano que contenga el gen normal en el sitio correspondiente, entonces esta célula transfectada debe recuperar su capacidad de reparar DNA y mostrar resistencia normal a la luz UV. Las pocas células de la población que recuperan su capacidad normal de reparar DNA se pueden seleccionar entonces exponiendo el cultivo de células a la luz UV, tratamiento que debe matar a las células todavía con reparación deficiente. (La selección también se puede efectuar incorporando genes que resisten la acción de ciertos fármacos en los fragmentos de DNA humano y seleccionando las células transfectadas usando el fármaco.) Una vez obtenido un cultivo de células transfectadas resistentes a UV se puede extraer el DNA, y el fragmento de DNA humano encargado de corregir la deficiencia de reparación del DNA se puede aislar e identificar el producto que codifica. Los fragmentos de DNA humano pueden purificarse selectivamente a partir del DNA de roedores debido a que contienen secuencias de DNA marcadoras que se pueden usar como blancos para las sondas de DNA utilizadas durante el procedimiento de aislamiento.

Utilizando esta técnica de transfección-corrección, los investigadores pudieron aislar varios genes de DNA humano que codifican proteínas para reparar DNA. Puesto que se aislaron debido a su capacidad de complementar defectos en células de roedores, estos genes humanos se denominan genes RECC (reparación por excisión cruzada complementaria). El primero de estos genes aislado se llamó RECC1, y la secuencia de aminoácidos codificada mostró homología significativa con un gen denominado RAD10 aislado de células de levadura y que se sabía participaba en la reparación por excisión de DNA.⁷ Además de suministrar una base para investigar el papel de los genes de reparación humanos en comparación con sus contrapartes, las levaduras, cuya función estaba bastante bien establecida, estos experimentos proporcionaron la primera indicación de que los sistemas de reparación de DNA eran altamente conservados en organismos eucariotas, desde levaduras hasta el hombre.

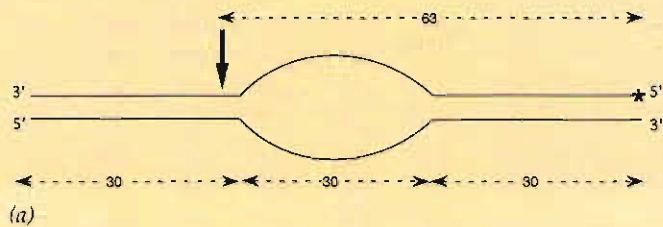
En los siguientes años se establecieron otras correlaciones entre los genes RECC humanos y los genes RAD de levaduras.

Por ejemplo, se descubrió un segundo gen humano capaz de corregir una deficiencia de reparación de DNA en células de roedores sensibles a la radiación UV y se le designó como RECC2. El análisis de la secuencia de nucleótidos del RECC2 indica que codifica un polipéptido homólogo al RAD3, un gen de levadura cuyo producto actúa como DNA helicasa 5' → 3' dependiente de ATP.⁸ Las helicasas son enzimas que participan en el desenrollamiento del DNA dúplex durante transcripción, duplicación, reparación y recombinación (pág. 557). También se descubrió un tercer gen humano, RECC3, que codifica una proteína con actividad de DNA helicasa. De igual importancia, la RECC3 fue capaz de corregir la sensibilidad UV de las células de uno de los grupos de complementación XP, específicamente XP-B.⁹ Análisis subsecuentes indicaron que uno de los pacientes afectados con XP cuyas células corresponden al grupo de complementación XP-B era portador de una mutación del gen RECC3 en el cual una citidina del DNA estaba sustituida por una adenina. En los siguientes años se aislaron algunos genes de DNA humano capaces de corregir las deficiencias de reparación de DNA en estirpes de células de roedores y en fibroblastos de piel derivados de pacientes con XP, y se pudieron correlacionar con genes RAD de levaduras.^{Revisado en 10}

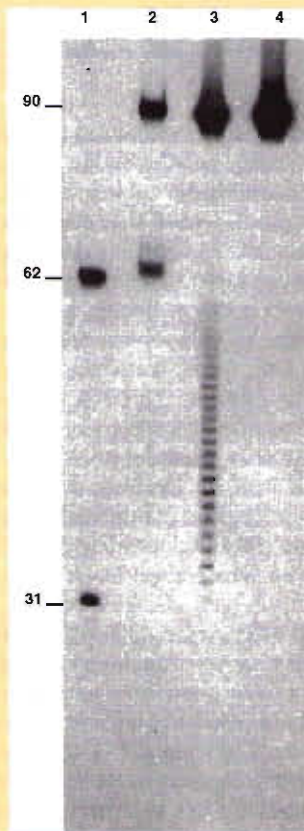
Un conocimiento importante acerca del papel del producto del gen RECC3 provino de un estudio efectuado en 1993 sobre un tema que se pensaba no tenía relación alguna con la reparación del DNA. En la página 449, se describió que el inicio de la transcripción requiere el ensamblado de un complejo de preinicio constituido por RNA polimerasa junto con algunas proteínas conocidas como factores generales de transcripción. Uno de los factores que opera con la RNA polimerasa II se denomina TFIIF, una proteína de múltiples subunidades que previamente se había demostrado que actuaba como proteincinasa para fosforilar el dominio C terminal de la polimerasa antes de la transcripción. Estudios efectuados en los laboratorios de Jean-Marc Egly, en Estrasburgo, Francia, demostraron que el TFIIF purificado podía actuar como helicasa dependiente de ATP en diferentes tipos de ensayos. Por ejemplo, TFIIF podía desplazar un oligonucleótido marcado de una cadena complementaria a la cual se encontraba enlazado mediante un puente de hidrógeno. Se cree que la apertura del DNA dúplex por la helicasa suministra acceso a la RNA polimerasa a la plantilla de DNA de la cadena. Cuando se determinaron las secuencias de aminoácidos del triptico digerido de subunidades de polipéptido de TFIIF se hizo un sorprendente descubrimiento.¹¹ La secuencia de aminoácidos de una de las subunidades era idéntica a la determinada previamente para el producto del gen RECC3. Estos datos sugieren que el producto del gen RECC3 tiene un doble papel en el desenrollamiento del DNA para preparar tanto la transcripción como la reparación del mismo. Esta expectativa pronto se confirmó al demostrar que la helicasa de RAD25, el equivalente de RECC3 en las levaduras, también se requiere para la transcripción mediada por la RNE polimerasa II.^{12,13} Algunas publicaciones recientes demuestran que el producto del gen RECC2 también es una subunidad del complejo TFIIF.

Estos descubrimientos pueden indicar por qué se repara preferencialmente la plantilla de la cadena de genes activos a

nivel de transcripción. Si una RNA polimerasa se desplaza a lo largo de la plantilla de la cadena y se detiene al encontrar una lesión en su camino, entonces TFIIH puede "desembarcarse" del mecanismo de transcripción y desenrollar el DNA dúplex



(a)



(b)

FIGURA VE 13-5. a) XPG (producto del gen XPG) secciona la estructura del DNA mostrado aquí en el lado 3' de la burbuja, según se describe en el texto. El asterisco en el extremo 5' de una de las cadenas es el sitio del átomo ^{32}P radiactivo. b) Resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida. La línea 1 contiene oligonucleótidos marcados con ^{32}P de tamaño conocido (indicadas a la izquierda del gel), que sirve para calibrar el gel. La línea 2 contiene los productos del experimento descrito en el texto en el cual se incubó la burbuja del sustrato de DNA con XPG antes de la electroforesis. El nucleótido-63, con una cadena de DNA marcada, se generó por la actividad endonucleolítica de XPG. La línea 3 muestra un experimento que verifica la estructura del sustrato. La línea 4 señala un testigo en el cual la burbuja de sustrato de DNA no se incubó con XPG. (Reimpreso con permiso según Anne O'Donovan y cols. *Nature* 371:432, 1994; copyright 1994 Macmillan Magazines Limited.)

generando regiones de una sola cadena accesible a otras proteínas de reparación. Uno de los primeros pasos en la reparación por excisión de nucleótido es una incisión de cinco nucleótidos en el lado 5' de la lesión. Datos recientes indican que esta incisión tiene lugar gracias a una endonucleasa codificada por el gen XPG, o sea, el gen defectuoso en personas con XP cuyas células caen dentro del grupo de complementación XP-G.¹⁴ Uno de los experimentos descritos en este trabajo se ilustra en la figura VE 13-5. En este experimento se construyó una molécula de doble cadena de DNA de 90 pares de bases de longitud, incluyendo una región central de 30 pares de bases no complementarias que formaban una burbuja de una sola cadena. Se cree que esta estructura de burbuja es parecida a la que se forma cuando el DNA dañado se desenrolla en la región de una lesión en masa, como un dímero de pirimidina. El extremo 5' de una de las cadenas fue marcado con ^{32}P , según se indica con el asterisco en la figura. El DNA que contiene la burbuja se incubó con una preparación de proteína purificada codificada por el gen XP-G y los productos de la reacción del DNA se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizadoras (o sea, condiciones donde el DNA puede presentarse como cadenas simples). Los resultados de la electroforesis se muestran en la columna dos del gel, indicando la presencia de una cadena de DNA aproximadamente de 63 nucleótidos de longitud. Como se muestra en el dibujo acompañante, estos resultados indican que la proteína XPG desdobra la cadena marcada de la burbuja cercana al extremo 3' de la región donde no hay pares, aproximadamente a tres bases de la región adyacente de doble cadena (indicada por la flecha en el diagrama). Así se demostró que la endonucleasa XPG desdobra una molécula de DNA que contiene una burbuja semejante a un sitio específico donde debe efectuarse una reparación en la estructura. Como era de esperar, las células cultivadas de pacientes XP-G no producen proteínas con esta actividad endonucleolítica particular. Conforme se purifiquen más y más proteínas implicadas en la reparación por excisión de nucleótidos y se determine su actividad *in vitro*, más pronto se dilucidará la secuencia de acontecimientos necesarios para este tipo de reparación.

BIBLIOGRAFIA

1. Cleaver, J.E. 1968. Defective repair duplication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature* 218:652-656.
2. Setlow, R.B. y cols. 1969. Evidence that xeroderma pigmentosum cells do not perform the first step in the repair of ultraviolet damage to their DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 64:1035-1041.
3. Siniscalco, M. y cols. 1969. Evidence for intergenic complementation in hybrid cells derived from two human diploid strains each carrying an X-linked mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 62:793-799.
4. de Weerd-Kastelein, E.A., Keijzer, W. y Bootsma, D. 1972. Genetic heterogeneity of xeroderma pigmentosum demonstrated by somatic cell hybridization. *Nature New Biol.* 228:80-83.
5. Moshell, A.N. y cols. 1983. A new patient with both xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome establishes the new xeroderma complementation group H. En E.C. Friedberg y B.A. Bridges, eds. *Cellular Responses to DNA Damage*, Liss, pp. 11-88.

6. Thompson, L.H. 1981. Genetic diversity of UV-sensitive DNA repair mutants of Chinese hamster ovary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:3734-3737.
7. van Duin, M. 1986. Molecular characterization of the human excision repair gene *ERCC-1*: cDNA cloning and amino acid homology with the yeast DNA repair gene *RAD10*. *Cell* 44:913-923.
8. Weber, C.A. y cols. 1990. *ERCC2*: cDNA cloning and molecular characterization of a human nucleotide excision repair gene with high homology to yeast *RAD3*. *EMBO J.* 9:1437-1447.
9. Weeda, G. y cols. 1990. A presumed DNA helicase encoded by *ERCC-3* is involved in the human repair disorders xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome. *Cell* 62:777-791.
10. Hoeijmakers, J.H.J. 1993. Nucleotide excision repair II: From yeast to mammals. *Trends Genetics* 9:211-217.
11. Schaeffer, L. y cols. 1993. DNA repair helicase: A component of BTF (TFIIH) basic transcription factor. *Science* 260:58-63.
12. Drapkin, R. y cols. 1994. Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II. *Nature* 368:769-772.
13. Guzder, S.N. y cols. 1994. *RAD25* is a DNA helicase required for DNA repair and DNA polymerase II transcription. *Nature* 369:578-581.
14. O'Donovan, A. y cols. 1994. XPG endonuclease makes the 3' incision in human DNA nucleotide excision repair. *Nature* 371:432-435.

SINOPSIS

La duplicación del DNA es semiconservadora, lo que quiere decir que durante la división celular cada una de las células hijas recibe una mitad del dúplex original. Este mecanismo de duplicación fue sugerido por primera vez por Watson y Crick como parte de su modelo de la estructura del DNA. Ellos sugirieron que la duplicación ocurre por separación gradual de las cadenas debido al rompimiento de los puentes de hidrógeno, de modo que cada cadena puede servir como plantilla para la formación de una cadena complementaria. Pronto se confirmó este modelo en células bacterianas y eucariotas al demostrar que las células de una generación transferidas a medios marcados con radiactividad producen células hijas cuyo DNA posee una cadena marcada y una cadena no marcada (p. 547).

Los mecanismos de duplicación son mejor comprendidos en la célula bacteriana. La duplicación se inicia en un solo origen sobre el cromosoma bacteriano circular y procede hacia afuera en ambas direcciones como un par de bifurcaciones de duplicación. Las bifurcaciones de duplicación son sitios donde se desenrolla la doble hélice y se incorporan nucleótidos en ambas cadenas recién sintetizadas (p. 548).

La síntesis de DNA es catalizada por una familia de DNA polimerasas. La primera de estas enzimas que se caracterizó fue la DNA polimerasa I de *E. coli*. Para catalizar la reacción de polimerización, la enzima requiere cuatro trifosfatos de desoxirribonucleósido, una plantilla de la cadena que debe copiar y un iniciador que contenga un 3' OH libre al cual se puedan añadir nucleótidos. El iniciador es necesario porque la enzima no puede empezar la formación de una cadena de DNA. Más bien, sólo es capaz de añadir nucleótidos a la terminal 3' hidroxilo de una cadena existente. Otra característica inesperada de la DNA polimerasa I es que sólo puede polimerizar una cadena en la dirección 5' → 3'. Se supone que las dos cadenas nuevas serían sintetizadas en direcciones opuestas por polimerasas que se mueven en direcciones opuestas a lo largo de dos plantillas de las cadenas progenitoras. Este descubrimiento se explicó al demostrar que las dos cadenas se sintetizan de manera muy diferente (p. 551).

Una de las cadenas recién sintetizadas (la cadena delantera) crece en dirección hacia la bifurcación de duplicación y se sintetiza de manera continua. La otra cadena recién sintetizada (la cadena retrasada) crece alejándose de la bifurcación y se sintetiza de manera discontinua. En células bacterianas, la cadena retrasada se sintetiza como fragmentos de unos 1 000 a 2 000 nucleótidos de largo, denominados fragmentos de Okasaki, que se unen por enlaces covalentes entre sí mediante una DNA ligasa. En contraste, la cadena delantera se sintetiza como cadena simple continua. La DNA polimerasa no puede iniciar la cadena continua ni los fragmentos de Okasaki, sino que sólo puede formar un iniciador RNA corto sintetizado por un tipo de RNA polimerasa. Después de ensamblar el iniciador RNA, la DNA polimerasa continúa sintetizando la cadena o el fragmento como DNA. A continuación el RNA se descompone y la abertura se llena con un DNA (p. 553).

Lo que ocurre en la bifurcación de duplicación requiere diferentes tipos de proteínas con funciones especializadas. Entre estas se incluye una DNA girasa, que es un tipo de topoisomerasa II requerida para liberar la tensión que se genera como resultado del desenrollamiento del DNA; una DNA helicasa que desenrolla el DNA separando las cadenas; proteínas que se unen selectivamente al DNA de una sola cadena y evitan que se vuelvan a reasociar; una RNA primasa, que es la enzima que sintetiza los iniciadores RNA al principio de cada fragmento de Okasaki; y una DNA ligasa que sella los fragmentos de la cadena retrasada para formar un polinucleótido continuo. La DNA polimerasa III es la enzima sintetizadora de DNA primaria que añade nucleótidos a cada iniciador RNA, en tanto que la DNA polimerasa I se encarga de eliminar los iniciadores RNA y remplazarlos con DNA. Se cree que dos moléculas de DNA polimerasa III se desplazan juntas en forma de un complejo en direcciones opuestas a lo largo de sus respectivas plantillas. Esto se logra manteniendo la plantilla de la cadena retrasada enroscada hacia atrás sobre sí misma. El inicio de la duplicación requiere proteínas adicionales que se enlazan a secuencias repetitivas de nucleótidos dentro del origen, lo que provoca la separación de las cadenas y el reclutamiento de las proteínas necesarias para la duplicación (p. 550).

Las DNA polimerasas poseen sitios catalíticos separados para la polimerización y la descomposición de las cadenas de ácidos nucleicos. La mayor parte de las DNA polimerasas poseen exonucleasas $5' \rightarrow 3'$ y $3' \rightarrow 5'$. La primera de estas dos nucleasas se usa para degradar a los iniciadores RNA al principio de los fragmentos de Okasaki, y la segunda se utiliza para eliminar un nucleótido inapropiado luego de su incorporación equivocada, contribuyendo así a la fidelidad de la duplicación. Se estima que cerca de uno de cada 10^9 nucleótidos se incorporan de manera incorrecta durante la duplicación en *E. coli*. Este elevado grado de fidelidad se mantiene mediante tres comprobaciones separadas: 1) la DNA polimerasa puede calibrar la geometría del par de bases formado por un nucleótido recién incorporado antes que el nucleótido se una por enlace covalente al extremo del iniciador; 2) cuando se incorpora un nucleótido incorrecto, de ordinario es eliminado por la actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$ de la polimerasa, que actúa como mecanismo corrector de pruebas; 3) se puede eliminar un nucleótido incorrecto incorporado después de la duplicación mediante un proceso de reparación de bases no coincidente (p. 560).

La duplicación en células eucariotas sigue mecanismos similares y emplea proteínas semejantes a las empleadas en procariontes. Hasta la fecha se han aislado cinco DNA polimerasas diferentes de las células eucariotas; todas ellas alargan las cadenas de DNA en la dirección $5' \rightarrow 3'$. Ninguna de ellas puede iniciar la síntesis de una cadena sin iniciador. La mayor parte posee actividad exonucleasa $3' \rightarrow 5'$, garantizando que la duplicación ocurra con alta fidelidad. A diferencia de los procariontes, la duplicación en eucariotes se inicia simultáneamente en muchos sitios a lo largo de un cromosoma con bifurcaciones de duplicación que proceden hacia afuera en ambas direcciones a partir del sitio de inicio. Los estudios con levaduras indican que la duplicación se origina en sitios que contienen un lugar específico de enlace para un complejo multiproteínico esencial (p. 562).

La duplicación en células eucariotas está íntimamente relacionada con estructuras nucleares. Las pruebas indican que gran parte del mecanismo necesario para la duplicación se relaciona con la matriz nuclear. Además, las bifurcaciones de duplicación activas en cualquier momento dado al parecer se

localizan entre unos 50 a 250 sitios llamados focos de duplicación, que también contienen las enzimas encargadas de metilar DNA después de su síntesis. El DNA recién sintetizado rápidamente se asocia a los nucleosomas. Los octámeros de histona presentes antes de la duplicación permanecen intactos y pasan a las hijas dúplex, en tanto que las histonas recién sintetizadas se ensamblan en una nueva partícula central. Se cree que las partículas centrales nuevas y viejas se distribuyen al azar entre los complejos de hijas (p. 564).

El DNA está expuesto a muchas influencias ambientales nocivas, incluyendo radiación ionizante, sustancias químicas comunes y radiación ultravioleta. Las células poseen varios sistemas para reconocer y reparar los daños resultantes. Se estima que menos de una base se modifica en 1 000 salvamentos efectuados por los sistemas de reparación de la célula. En algunos casos, el daño se puede reparar directamente, pero en la mayor parte la sección dañada debe ser escindida y sustituida por DNA recién sintetizado. Se conocen tres principales tipos de sistemas para reparación del DNA. Los sistemas de reparación por excisión de nucleótido (REN) operan por eliminación de una pequeña parte de la cadena de DNA que contiene una lesión generalizada, como los dímeros de pirimidina. Durante la reparación REN, una endonucleasa efectúa un par de incisiones, una helicasa elimina el oligonucleótido dañado, la abertura se llena mediante la acción de una DNA polimerasa y una DNA ligasa sella la cadena. Las plantillas de cadenas para genes activamente transcritos tienen prioridad en el sistema de reparación por excisión de nucleótido. La reparación por excisión de bases actúa eliminando los nucleótidos alterados que provocan deformaciones menores en la hélice de DNA. Las células poseen varias glucosilasas capaces de reconocer y eliminar algunos tipos de bases alteradas. Una vez eliminada la base, la porción restante del nucleótido se separa mediante una endonucleasa, la abertura se amplía gracias a la acción de una fosfodiesterasa, y se llena y sella mediante una polimerasa y una ligasa. La reparación de los pares de bases no coincidentes es un mecanismo que se encarga de eliminar a los nucleótidos incorrectos incorporados durante la duplicación que escaparon a la corrección de pruebas efectuada por la actividad de la polimerasa. La falta de grupos metilo en la cadena recién sintetizada en comparación con la cadena progenitora indica que debe ser reparada (p. 565).

PREGUNTAS DE REPASO

1. En su hipótesis original para la duplicación del DNA, Watson y Crick propusieron la síntesis continua de cadenas de DNA. ¿Cómo y por qué razón se ha modificado este concepto en los años subsecuentes?
2. ¿Qué significa duplicación semiconservadora? ¿Cómo se demostró esta característica de la duplicación en células bacterianas? ¿En células eucariotas?
3. ¿Por qué no se observan bandas pesadas en la parte superior de los tubos de centrifuga de la figura 13-3?
4. ¿Cómo se pueden obtener mutantes cuyos defectos se sitúen en los genes requeridos para una actividad esencial, como la duplicación del DNA?
5. Describir lo que ocurre durante un origen de duplicación al inicio de la misma, tanto en células bacterianas como en levaduras. ¿Qué significa que la duplicación es bidireccional?
6. ¿Por qué razones específicas las moléculas de DNA mostradas en la figura 13-7, a, no estimulan la polimerización de nucleótidos por la DNA polimerasa I? ¿Cuáles son las propiedades de una molécula de DNA que le permiten servir como plantilla para incorporar nucleótidos gracias a la acción de la DNA polimerasa I?
7. Describir el mecanismo de acción de las DNA polimerasas que operan sobre las cadenas de las dos plantillas y el

- efecto que tienen sobre la síntesis de la cadena retrasada en comparación con la cadena delantera.
8. Contrastar el papel de las DNA polimerasas I y III en la duplicación bacteriana.
 9. Describir el papel de la DNA helicasa, las cadenas únicas enlazadas, las pinzas β , la DNA girasa, y la DNA ligasa durante la duplicación de una bacteria.
 10. ¿Cuál es la ventaja de mantener el DNA de la plantilla de la cadena retrasada enrollada sobre sí misma hacia atrás, como en la figura 13-16, a?
 11. ¿En qué difieren las dos actividades exonucleasa de la DNA polimerasa I entre sí? ¿Cuáles son sus respectivos papeles en el proceso total de duplicación?

12. Describir los factores que contribuyen a la elevada fidelidad de la duplicación del DNA.
13. ¿Cuál es la principal diferencia entre la duplicación bacteriana y la eucariota que permite a una célula eucariota duplicar su DNA en un periodo razonable?
14. Comparar lo que ocurre durante la reparación por excisión de nucleótido y la reparación por excisión de base.
15. ¿Por qué es importante en la reparación de bases no coincidentes que la célula pueda reconocer diferencias entre la cadena progenitora y las cadenas recién sintetizadas? ¿Cómo se logra dicho reconocimiento?

PREGUNTAS ANALITICAS

1. Asumiendo que la mayor parte de las mutaciones ocurren durante la duplicación, ¿sería de esperar que la frecuencia de mutaciones de leucocitos adultos muestre alguna diferencia en comparación con las de células musculares o esqueléticas? ¿Por qué sí o por qué no?
2. De ordinario se dice que la molécula de DNA polimerasa se desplaza a lo largo de la plantilla conforme sintetiza una cadena complementaria de DNA. En el modelo que se muestra en la figura 13-25, ¿cómo se podría corregir esta afirmación?
3. Supongamos que Meselson y Stahl efectuaron su experimento desarrollando células en un medio con ^{14}N y luego transfirieron las células a un medio con ^{15}N . ¿Cómo aparecerían las bandas en el tubo de la centrífuga si la duplicación fuera semiconservadora? ¿Si fuera conservadora? ¿Si fuera dispersiva?
4. Observar la autorradiografía de la figura 13-5; ¿cómo aparecería esta molécula de DNA luego de dos vueltas completas de duplicación en ^3H -timidina? ¿Después de 2.8 vueltas?
5. ¿Cómo aparecerían los cromosomas en el experimento efectuado sobre células eucariotas mostrado en la figura 13-4 si la duplicación ocurre por un mecanismo conservador o dispersivo?
6. ¿Qué propiedades de *oriC* hacen indispensable incluir un origen de duplicación en un experimento *in vitro* para probar el papel de una proteína particular de duplicación?
7. Dibujar una molécula de DNA de doble cadena parcial que no sirva como plantilla para la síntesis del DNA mediante la acción de la DNA polimerasa I.
8. Algunos mutantes bacterianos sensibles a temperatura detienen de inmediato la duplicación luego de elevación de la temperatura, en tanto que otros continúan duplican-

do su DNA por un lapso antes de detener dicha actividad, e incluso otros continúan hasta que concluye la vuelta de duplicación. ¿Cómo se pueden diferenciar estos tres tipos de mutantes?

9. Asumiendo que la tasa de errores durante la duplicación fuera igual en células humanas que en células bacterianas (cerca de 10^{-9}), ¿cuál sería el impacto sobre estas dos células diferentes?
10. La figura 13-22 muestra los resultados de un experimento en el cual se incubaron células con ^3H -timidina durante menos de 30 minutos antes de fijarlas. ¿Cuál sería el aspecto de esta fotografía después de un periodo de una hora de marcado? ¿Se podría concluir que todo el genoma se duplica en una hora? En caso negativo, ¿por qué no?
11. ¿Por qué durante el inicio de la duplicación se puede separar una cadena sin ayuda de la DNA helicasa, pero en otros sitios la separación de cadenas requiere este tipo de enzima?
12. ¿Qué ventaja sería de esperar si la duplicación de DNA ocurre junto con la duplicación de la matriz nuclear y no con la del nucleoplasma? ¿Cuáles son las ventajas de que la duplicación ocurra en un pequeño número de focos de duplicación?
13. ¿Por qué razón sería de esperar que las células humanas cuenten con sistemas de reparación más eficientes en comparación con las células de una rana?
14. Supongamos que se comparan autorradiografías de dos células expuestas a ^3H -timidina, una que participó en la duplicación de DNA (fase S) y la otra no. ¿Cuál sería la expectativa entre las autorradiografías de dichas células?
15. Construir un modelo que explique la reparación preferencial del DNA activo a nivel de transcripción en comparación con el DNA silencioso a nivel de transcripción.

BIBLIOGRAFIA

Duplicación bacteriana y temas generales

- Baker, T.A. y Wicker, S.H. 1992. Genetics and enzymology of DNA replication in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Genetics* 26:447-477.
- Echols, H. y Goodman, M.F. 1991. Fidelity mechanisms in DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* 60:477-511.

- Hiraga, S. 1992. Chromosome and plasmid partition in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Biochem.* 61:283-306.
- Johnson, K.A. 1993. Conformational coupling in DNA polymerase fidelity. *Ann. Rev. Biochem.* 62:685-713.
- Joyce, C.M. y Steitz, T.A. 1994. Function and structure relations in DNA polymerases. *Ann. Rev. Biochem.* 63:777-822.

- Kelman, Z. y O'Donnell, M. 1995. DNA polymerase III holoenzyme. *Ann. Rev. Biochem.* 64:171-200.
- Kornberg, A. 1988. DNA replication. *J. Biol. Chem.* 263:1-4.
- Kornberg, A. 1989. Never a dull enzyme. *Ann. Rev. Biochem.* 58:1-30.
- Kornberg, A. y Baker, T.A. 1992. *DNA Replication*. 2a. edición, W.H. Freeman.
- Marians, K.J. 1992. Prokaryotic DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* 61:673-719.
- Matson, S.W. y cols. 1994. DNA helicases: Enzymes with essential roles in all aspects of DNA metabolism. *Bioess.* 16:13-22.
- Meselson, M. y Stahl, F.W. 1958. The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 44:671-682.
- Stillman, B. 1994. Smart machines at the DNA duplication fork. *Cell* 78:725-728.
- Duplicación en células eucariotas**
- Blow, J.J. 1993. Methyltransferases in foci. *Nature* 361:684-685.
- Coverly, D. y Laskey, R.A. 1994. Regulation of eukaryotic DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.* 63:745-776.
- DePamphilis, M.L. 1993. Origins of DNA replication that function in eukaryotic cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:434-441.
- Diffley, J.F. 1994. Eukaryotic DNA replication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:368-372.
- Diller, J.D. y Raghuraman. 1994. Eukaryotic replication origins: Control in time and space. *Trends in Biochem. Sci.* 19:320-325.
- Fisher, P.A. 1994. Enzymologic mechanism of replicative DNA polymerases in higher eukaryotes. *Prog. Nucleic Acid Res. and Mol. Biol.* 47:371-397.
- Hozak, P. y Cook, P.R. 1994. Replication factories. *Trends in Cell Biol.* 4:48-52.
- Huberman, J.A. 1994. A tale of two functions. *Nature* 367:20-21.
- Lewin, B. 1994. *Genes V*. Oxford. Li, J.J. y Alberts, B.M. 1992. Eukaryotic initiation rites. *Nature* 357:114-115.
- So, A.G. y Downey, K.M. 1992. Eukaryotic DNA duplication. *Crit. Revs. Bioch. Mol. Biol.* 27:129-155.
- Stillman, B. 1993. Replicator renaissance. *Nature* 366:506-507.
- Taylor, J.H. 1958. The duplication of chromosomes. *Sci. Am.* 198:37-42 (junio).
- Toyn, J.H. y cols. 1995. The activation of DNA replication in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 20:70-73.
- Reparación del DNA y XP**
- Bootsma, D. y Hoeijmakers, J.H.J. 1994. The molecular basis of nucleotide excision repair. *Mutation Res.* 307:15.
- Cleaver, J.E. 1994. It was a very good year for DNA repair. *Cell* 76:1-4.
- Freiberg, E.C. y Henning, K.A. 1993. The conundrum of xeroderma pigmentosum—A rare disease with frequent complexities. *Mutation Res.* 289:47-53.
- Hoeijmakers, J.H.J. 1993. Nucleotide excision repair I. From yeast to mammals. *Trends Genet.* 9:211-217.
- Tanaka, K. y Wood, R.D. 1994. Xeroderma pigmentosum and nucleotide excision repair. *Trends Biochem. Sci.* 19:83-86.

Reproducción celular

14-1 El ciclo de la célula

14-2 Fase M: mitosis y citocinesis

14-3 Meiosis

La perspectiva humana: No disyunción meiótica y sus consecuencias

La vía experimental: Descubrimiento y caracterización del factor promotor de maduración (FPM)

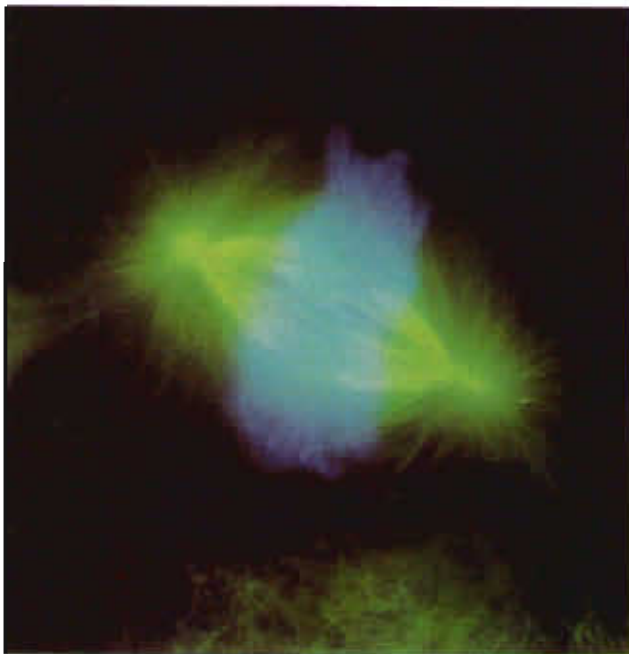


FIGURA 14-A. Micrografía de fluorescencia de una célula cultivada del pulmón de una salamandra acuática en el proceso de mitosis. El huso mitótico aparece de color verde después de ser marcado con un anticuerpo monoclonal contra tubulina, en tanto que los cromosomas aparecen en azul luego de marcarlos con una coloración fluorescente. (Cortesía de Conly L. Rieder, State University of New York, Albany.)

Según el tercer principio de la teoría celular, sólo se originan nuevas células a partir de otras células vivientes; este proceso se denomina **división celular**. En un organismo multicelular, como el hombre o un árbol de encino, incontables divisiones de un cigoto unicelular producen un organismo de sorprendente complejidad y organización celular. La división celular no se detiene con la formación del organismo maduro, sino que continúa durante toda la vida. Se estima que en el adulto humano más de 25 millones de células sufren división cada segundo. Esta enorme producción de células es necesaria para sustituir las que han envejecido o muerto. Por ejemplo, las células sanguíneas desgastadas son eliminadas y sustituidas por nuevas células a una velocidad de casi 100 millones por minuto.

Cada célula en etapa de división se denomina *célula madre*, y sus descendientes se llaman *células hijas*. Hay una razón para usar estos términos “familiares”. La célula madre transmite copias de su información genética a sus células hijas, que representan la siguiente generación celular. A su vez, las células hijas llegarán a ser células madres de sus propias células hijas, transmitiendo los mismos genes que heredaron de su madre a otra nueva generación de células. Por esta razón, la división celular con frecuencia se denomina *reproducción celular*.

La división celular es algo más que la simple producción de células; es la base para la reproducción de los organismos a través de la formación de gametos celulares. Por lo tanto, la división celular constituye el enlace entre un progenitor y su descendencia; entre especies vivientes y sus ancestros ya extinguidos, y entre los seres humanos y los primeros organismos celulares más primitivos.

14-1 El ciclo de la célula

Suele pensarse acerca de los procesos biológicos en términos de ciclos, que incluyen los de vida, los metabólicos y los fisiológicos. La vida es un proceso continuo en el tiempo y debe existir una renovación continua o retorno a un estado inicial, de modo que el proceso pueda ocurrir una y otra vez. Se puede decir que cualquier célula tiene vida, igual que cualquier organismo determinado. La vida de una célula se inicia con su formación a través de la división de una célula madre y termina con la formación de sus células hijas o con su muerte. Las etapas a través de las cuales pasa la célula desde una división celular a la siguiente constituyen el **ciclo de la célula** (fig. 14-1).

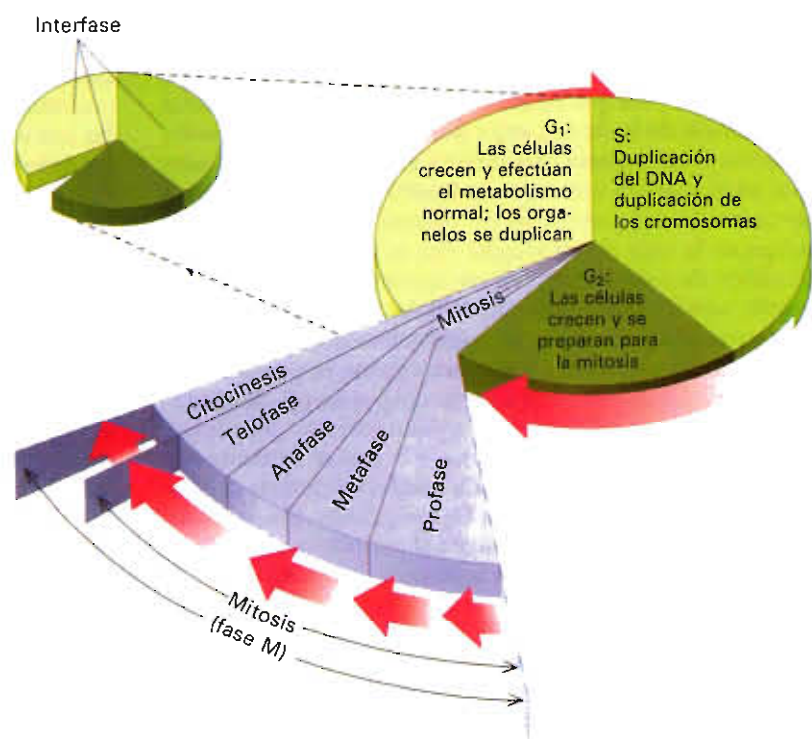
El ciclo de la célula se divide en dos fases principales según las actividades celulares fácilmente visibles con el microscopio de luz; éstas son la fase M (M = mitótica) y la interfase. La **fase M** incluye: 1) mitosis, durante la cual los cromosomas duplicados se reparten entre dos núcleos, y 2) citocinesis, durante la cual toda la célula se divide físicamente en dos células hijas. Según el porcentaje promedio relativamente pequeño de células en mitosis observadas en un tejido o en un cultivo en cualquier momento, es evidente que la mayor parte del ciclo de la célula transcurre en **interfase**. La fase M de ordinario sólo dura de 30 minutos a una hora, pero la interfase puede prolongarse horas, días, semanas o mayor tiempo según el tipo de célula. Como se analiza más adelante, en la fase M la célula se concentra en las actividades necesarias para la división celular: periodo donde la síntesis de macromoléculas por lo general se suprime. En

contraste, la interfase es un periodo donde la célula crece en volumen y efectúa funciones metabólicas activas, como oxidación de glucosa, transcripción, traducción y duplicación.

En la fase M, el contenido de la célula se divide físicamente y durante la interfase ocurren numerosos preparativos para la mitosis inminente, incluyendo los importantes sucesos que implican la duplicación del DNA celular. Podríamos imaginar que una célula llega a su etapa de duplicación a través del periodo de interfase, pero estudios iniciales sobre células cultivadas demostraron que éste no era el caso. Cuando se administra ^3H -timidina a un cultivo de células durante un breve periodo (p. ej., 30 minutos) y luego se toma una muestra de dichas células, se fija, se seca sobre una laminilla y luego se examina mediante autorradiografía, se encuentra que cierto porcentaje de las células presentan núcleos radiactivos. Sin embargo, ninguna de las células que participan en la mitosis en el momento de la fijación (según puede juzgarse por sus cromosomas condensados) incorpora el compuesto radiactivo. Los cromosomas de células mitóticas no están marcados porque no participan en la duplicación del DNA durante el periodo de marcaje.

Si se espera de una a pocas horas antes de tomar la muestra de células, en general todavía no se encuentran células en mitosis marcadas (fig. 14-2). A partir de estos resultados se puede concluir que hay un periodo definido, llamado G_2 (de segunda abertura), entre el final de la síntesis de DNA y el inicio de la fase M. La duración de G_2 se manifiesta continuando la toma de muestras de células del cultivo hasta observar cromosomas mitóticos marcados. Las

FIGURA 14-1. Ciclo de la célula eucariota. Este diagrama del ciclo celular indica las etapas de la célula desde una división a la siguiente. El ciclo celular se puede dividir en dos etapas: fase M e interfase. La fase M incluye las etapas sucesivas de mitosis y citocinesis. La interfase se divide en fases G_1 , S y G_2 , siendo la fase S equivalente al periodo de síntesis de DNA.



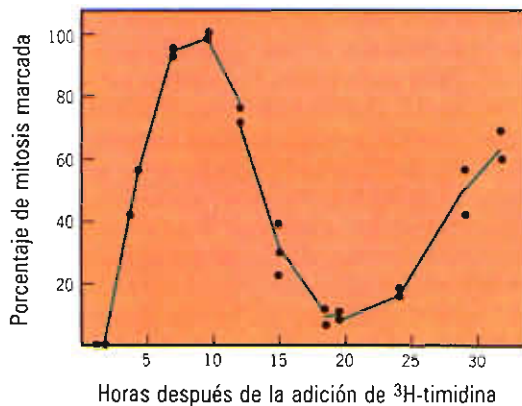


FIGURA 14-2. Los resultados experimentales demuestran que la duplicación ocurre durante un periodo definido del ciclo celular. Se incubaron células HeLa cultivadas durante 30 minutos en un medio con ^3H -timidina y luego se siguieron durante tiempos diferentes antes de fijarlas y prepararlas para autorradiografía. El plato de cultivo se rastreó en busca de células en mitosis en el momento de ser fijadas, y el porcentaje de las células mitóticas con cromosomas marcados se indica en la gráfica mostrada. (Según un estudio de R. Baserga y F. Wiebel.)

primeras mitosis marcadas que aparecen representan células que se encontraban en las últimas etapas de la síntesis del DNA en el momento que se inició la administración de ^3H -timidina. El tiempo transcurrido entre el inicio del periodo de marcación y la aparición de células con figuras mitóticas marcadas representa la duración de G_2 .

La fase del ciclo celular durante la cual ocurre la duplicación se denomina **fase S**, cuya duración se puede determinar mediante seguimiento continuo del porcentaje de mitosis marcadas. Cuando se lleva a cabo este seguimiento se observa que el porcentaje aumenta hasta alcanzar una cifra constante (meseta) y luego disminuye (fig. 14-2). El tiempo transcurrido para que aumente el número de mitosis marca la duración de la fase S, cuya duración también se puede determinar de manera más directa. El porcentaje de células que participan en una actividad particular es una medida aproximada del porcentaje de tiempo que esta actividad ocupa en la vida de las células. Por lo tanto, si sabemos la duración de todo el ciclo celular, la duración de la fase S se puede calcular directamente a partir del porcentaje de células cuyos núcleos presenten marca radiactiva durante un breve pulso con ^3H -timidina. De manera similar, se puede calcular la duración de la fase M a partir del porcentaje de células dentro de la población que participa en mitosis o citocinesis. Cuando se suman los periodos $G_2 + S + M$ es evidente que falta por explicar un periodo adicional en el ciclo de la célula. Esta otra fase, denominada G_1 (de primera abertura), se interpone entre M e I y representa el periodo que sigue a la mitosis y precede al inicio de la síntesis de DNA.

Ciclos celulares *in vivo*

Una de las propiedades que distingue a los diferentes tipos de células dentro de una planta o animal multicelular es su

capacidad de crecer y dividirse. Podemos reconocer tres categorías muy amplias de células:

1. Células con especialización estructural extrema, como las células nerviosas, células musculares, o eritrocitos que han perdido la capacidad de dividirse. Una vez diferenciadas, permanecen en ese estado hasta su muerte.
2. Células que normalmente no se dividen, pero que pueden iniciar la síntesis de DNA cuando se enfrentan a un estímulo apropiado. En este grupo se encuentran las células hepáticas, las cuales pueden proliferar cuando se extirpa quirúrgicamente una parte del hígado, y los linfocitos que proliferan cuando interactúan con el antígeno apropiado.
3. Células que normalmente poseen un nivel relativamente alto de actividad mitótica. Ciertos tejidos del cuerpo están sujetos a renovación continua y deben formarse continuamente células nuevas mediante división celular. En esta categoría se incluyen las células goniales (oogonias y espermatogonias) que dan lugar a los gametos, las estirpes celulares generadoras de leucocitos y eritrocitos, y las células epiteliales que revisten las cavidades y la superficie del cuerpo. Las células no especializadas del sistema meristémico apical localizadas en los extremos de las raíces y tallos de las plantas también muestran división celular rápida y continua.

El análisis de los ciclos celulares de una gran variedad de células revela la enorme variabilidad en la duración de sus ciclos celulares, en particular cuando se examinan en diferentes etapas del desarrollo. Los ciclos celulares pueden variar desde menos de 30 minutos en las células de muy rápida división del embrión en crecimiento (diferentes de los mamíferos que se dividen muy lentamente) hasta ciclos que duran varios meses en los tejidos de crecimiento lento, como el hígado de mamífero. Las células adultas de rápido crecimiento típicamente se dividen cada 12 a 36 horas. De las tres etapas de la interfase, G_1 es la más variable, aunque también pueden encontrarse diferencias mayores en S y G_2 . Con algunas notables excepciones, las células que han detenido su división, sea de manera transitoria o permanente, en el cuerpo o en el medio de cultivo, se encuentran en etapa previa al inicio de la síntesis de DNA. Las células "detenidas" en esta etapa de ordinario se dice que se encuentran en estado G_0 para distinguirlas de la fase típica G_1 que pronto se continúa con la fase S. Como veremos más adelante, una célula debe recibir una señal para proseguir desde G_1 a la fase S. Una vez recibida la señal para iniciar la duplicación del DNA, la célula casi invariablemente completa la vuelta de síntesis de DNA y continúa con la mitosis.

Actividades de síntesis durante el ciclo de la célula

Cuando se cuantifica la tasa total de síntesis de RNA o de proteínas en células del mismo tipo en diferentes etapas del ciclo celular, se observa que la tasa de estas actividades de síntesis es relativamente constante durante todo el periodo

de interfase y va seguido por un marcado descenso en la síntesis de proteínas y el cese virtual de la síntesis de RNA durante la mitosis. De manera similar, cuando se sigue la síntesis de las principales proteínas de una célula a través del ciclo celular mediante electroforesis bidimensional en gel (sección 17-7), casi todas las especies de proteínas parecen sintetizarse a tasas relativamente constantes durante la interfase. La principal excepción de esta regla se refiere a las histonas, cuya síntesis ocurre casi exclusivamente durante la fase S (fig. 14-3). No sólo la síntesis de este grupo de proteínas cromosómicas es la que se restringe a la fase S, sino también la síntesis de sus RNAm. Una vez concluida la duplicación, las histonas mensajeras se destruyen selectivamente.

Control del ciclo celular

La investigación del mecanismo que controla si una célula permanece en interfase o prosigue hasta la siguiente división no sólo es importante en biología celular, sino también tiene enormes implicaciones prácticas en la lucha contra el *cáncer, enfermedad producida por alteraciones en la capacidad de la célula para regular su propia división*. Como veremos en las siguientes páginas, hay dos sucesos en el ciclo de la célula sobre los cuales se enfocan los mecanismos de control de la célula; uno es el inicio de la duplicación del DNA, que ocurre en el punto de transición entre G_1 y S, y el otro es el inicio de la mitosis, que ocurre en la transición entre G_2 y M. En 1970, Potu Rao y Robert Johnson, de la

Universidad de Colorado, efectuaron una serie de experimentos de fusión celular que abrieron la puerta al conocimiento de la regulación de estos dos acontecimientos clave en el ciclo celular.

Rao y Johnson querían saber si el citoplasma de las células contiene factores reguladores capaces de afectar el estado del núcleo. Investigaron esa posibilidad fusionando células en diferentes etapas del ciclo celular. Por ejemplo, en un experimento, fusionaron células en etapa G_1 con células en etapa S y plantearon la pregunta de si el citoplasma donado por la célula en fase G_1 no duplicante contiene factores que impiden la duplicación del núcleo en fase S, o si el citoplasma de la célula duplicante en fase S contiene factores que estimulan la duplicación del núcleo en fase G_1 . Observaron que el núcleo del híbrido procedente de la célula en fase G_1 era activado para iniciar la duplicación mucho antes del momento en que debía ocurrir si no se hubiera fusionado. Este experimento sugirió que el citoplasma de una célula duplicante contiene uno o más factores que estimulan el inicio de la síntesis del DNA. Los resultados de otros experimentos de fusión celular sugirieron que la transición desde G_2 hasta M también era desencadenada por factores citoplásmicos. Por ejemplo, cuando se fusionaron células mitóticas con células en otras etapas del ciclo celular (fig. 14-4), las células mitóticas siempre indujeron condensación de la cromatina en el núcleo de la célula no mitótica. Si se fusionan una célula en fase G_1 y otra en fase M, la cromatina del núcleo en fase G_1 sufre *condensación cromosómica prematura* para formar un conjunto de cromosomas condensados alargados (fig. 14-4, a). Si la célula no mitótica se encuentra en la etapa G_2 , la condensación produce cromosomas visiblemente duplicados, lo que refleja el hecho de una duplicación previa (fig. 14-4, c). Aunque tanto la cromatina de la fase G_1 como la de la fase G_2 sufrieron condensación extensa, la relación de empacamiento (pág. 495) nunca alcanzó la observada en cromosomas verdaderamente mitóticos. La fusión de una célula mitótica con una célula en fase S también produce condensación de la cromatina en fase S (fig. 14-4, b). Sin embargo, la cromatina de una célula duplicante es particularmente sensible al daño, y la condensación da como resultado la formación de fragmentos cromosómicos "pulverizados" en vez de los cromosomas intactos compactados. Los resultados de estos experimentos sugieren que las transiciones desde G_1 a S y de G_2 a M se encuentran ambas bajo control positivo; o sea, ambas son inducidas por la presencia de algún agente estimulador.

Papel de las proteincinasas

Los conocimientos acerca de la naturaleza de los agentes que desencadenan la duplicación del DNA y conducen a la célula a la mitosis (o meiosis) se descubrieron en una serie de experimentos sobre oocitos y embriones tempranos de ranas y varios invertebrados (incluyendo almejas y erizos marinos). Los resultados de estos experimentos se describen en *La vía experimental*, al final del capítulo. En resumen, estos experimentos demostraron que la entrada de la célula a la fase M se desencadena por la activación de una proteincinasa denominada *factor promotor de maduración (FPM)*, que consiste en dos subunidades, una catalítica que efectúa la

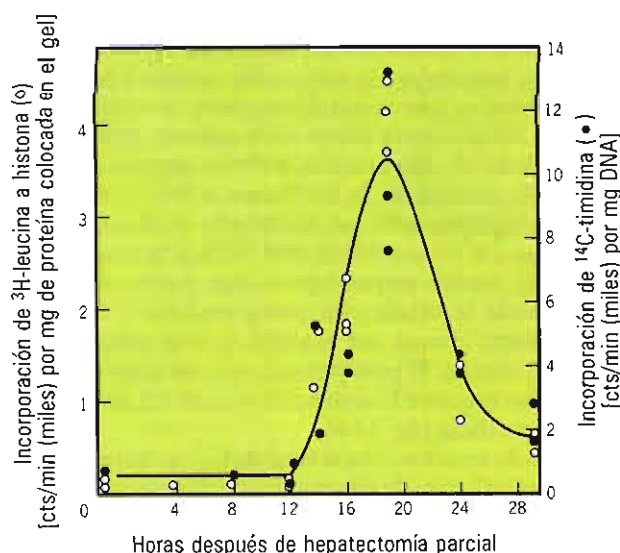


FIGURA 14-3. Demostración experimental de la síntesis coordinada de DNA e histonas. Se practicó hepatectomía parcial en ratas (extirpación de una parte del hígado) para estimular la proliferación sincronizada de celdillas hepáticas. En diferentes momentos después de la intervención se inyectó a los animales ^3H -leucina y ^{14}C -timidina, y una hora después se extirpó el hígado para determinar la radiactividad en el DNA (círculos cerrados) e histonas (círculos abiertos). (Reimpreso con permiso de Nature vol. 219:861, 1968, por S. Eakai y cols. Copyright 1968, Macmillan Magazines Ltd.)

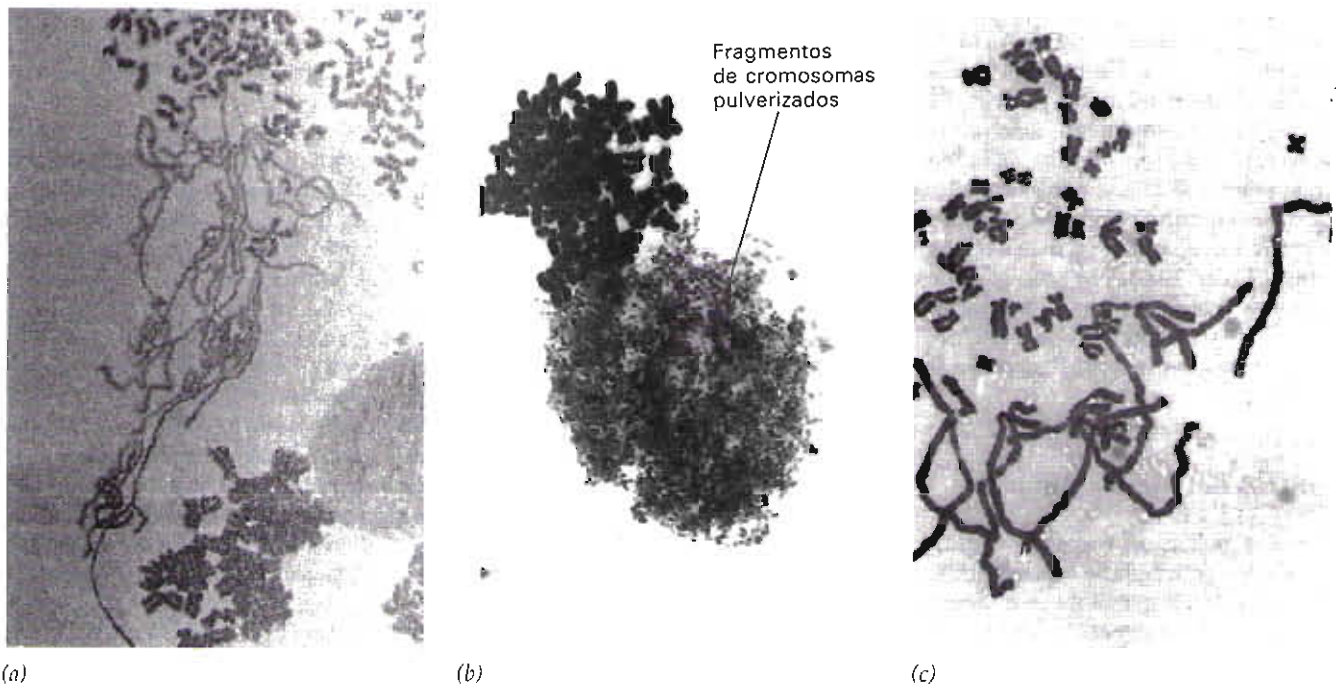


FIGURA 14-4. Demostración experimental de que las células contienen factores que desencadenan su entrada en mitosis. Las fotografías muestran los resultados de la fusión de una célula HeLa en fase M con una célula PtK2 de rata canguro que se encuentra en fase G₁ (a), fase S (b) o fase G₂ (c) en el momento de la fusión celular. Como se describe en el texto, la cromatina de las fases G₁ y G₂ de las células de la rata canguro sufre condensación prematura, en tanto que las células en fase S se pulverizan. Las cromátides alargadas de la célula en fase G₂ en C se encuentran duplicadas en comparación con aquellas de la célula G₁ en a. (Según Karl Sperling y Potu N. Rao, Humangenetik 23:237, 1974.)

transferencia de los grupos fosfato del ATP a los residuos específicos de serina y treonina de sustratos específicos de proteínas, y una subunidad reguladora que consta de una proteína denominada **ciclina**. El término “ciclina” se acuñó para indicar que la concentración de estas proteínas reguladoras se eleva y desciende siguiendo un patrón predecible conforme el ciclo de la célula avanza (fig. 14-5). Cuando la concentración de ciclina es baja, la cinasa carece de la subunidad ciclina y como resultado es inactiva. Cuando la concentración de ciclina alcanza un nivel suficiente, la cinasa se activa y desencadena la entrada de la célula a la fase M. Estos resultados sugieren que: 1) la célula avanza a través del ciclo celular dependiendo de una enzima cuya única actividad es fosforilar otras proteínas, y 2) la actividad de esta enzima es controlada por una “pareja” cuya concentración varía de una etapa del ciclo celular a otra.

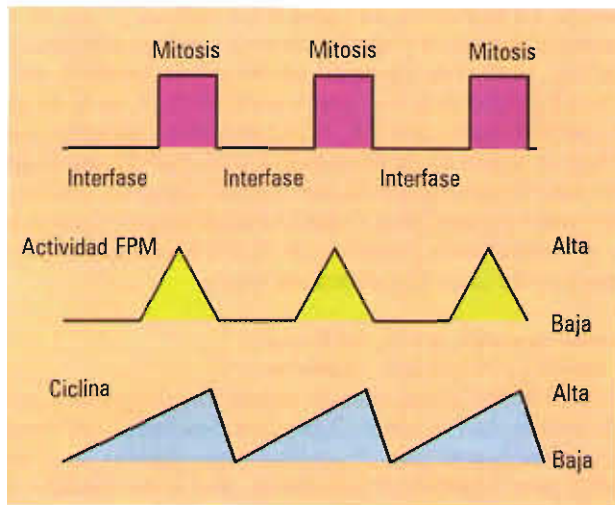
En años recientes, numerosos laboratorios han puesto su atención en enzimas parecidas a FPM denominadas **cinasas dependientes de ciclinas** (o **Cdks**). La atención se ha desviado de oocitos y embriones en desarrollo a células que pueden crecer en cultivo, principalmente células de levaduras y de mamífero. Las células de levadura son particularmente útiles por la disponibilidad de mutantes cuyas proteínas anormales afectan los diferentes procesos que contribuyen al ciclo celular.

La investigación acerca de factores que controlan el ciclo celular en levaduras se inició con el descubrimiento de un gen llamado *cdc2*. Cuando una mutación afecta a este

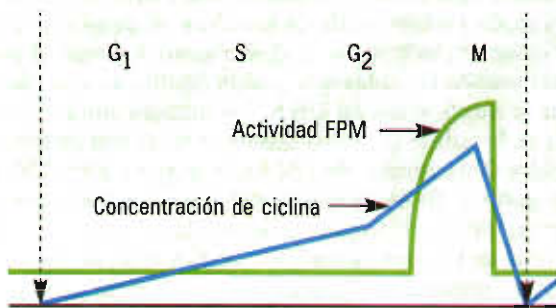
gen, el crecimiento de la célula se detiene en uno de dos puntos distintos del ciclo celular: justo antes de la duplicación del DNA o justo antes de la mitosis. El producto del gen *cdc2*¹ es homólogo a la subunidad catalítica de FPM; en otras palabras, es una cinasa dependiente de ciclina. Investigaciones subsiguientes acerca de levaduras, y también de muchas células de diferentes mamíferos, apoyan el concepto de que la progresión de la célula a través de su ciclo es regulada principalmente en dos etapas distintas del ciclo celular, una que ocurre casi al final de G₁ y la otra cerca del final de G₂. Ambas etapas representan puntos en el ciclo celular donde la célula está comprometida a iniciar un acontecimiento crucial: sea el inicio de la duplicación o su entrada en mitosis. El paso por cada uno de estos puntos de compromiso requiere la activación transitoria de Cdks por ciclinas específicas (fig. 14-6).

Luego de su activación al final de G₁, se cree que la Cdk inicia la fosforilación de algunas proteínas específicas necesarias para conducir la célula a la fase S. Aunque no se han

¹ El producto de este gen o de un gen homólogo en otros eucariotes con frecuencia se denomina *p34^{cdc2}* en las publicaciones; nos referiremos a este producto simplemente como *cdc2*. Podemos notar que el gen procedente de la fisión de la levadura (*Saccharomyces pombe*) de ordinario se conoce como *cdc2*, en tanto que el homólogo procedente de la gemación de la levadura (*S. cerevisiae*) en general se conoce como *CDC28*.



(a)



(b)

FIGURA 14-5. Variación de la concentración de ciclina y de FPM durante el ciclo celular. *a)* Cambios cíclicos durante el desarrollo temprano de una rana cuando ocurren divisiones mitóticas sincronizadas en todas las células del embrión. El trazo de arriba muestra la alternancia entre periodos de mitosis e interfase, el trazo de enmedio muestra los cambios cíclicos en la actividad FPM, y el trazo de abajo muestra los cambios cíclicos en la concentración de ciclinas que controlan la actividad relativa de la cinasa del FPM. *b)* Vista más próxima a los cambios en la concentración de FPM y de ciclina durante el ciclo de una sola célula en levaduras. (*a:* Reimpreso con permiso de A.W. Murray y M. Kirschner, *Science* 246:616, 1989; copyright 1989 American Association for the Advancement of Science.)

identificado claramente los sustratos de la fosforilación, se cree que incluyen ciertos factores de transcripción que estimulan la expresión de genes requeridos para la duplicación del DNA. Se piensa que la estimulación de la actividad Cdk al final de G_2 para fosforilar un grupo diferente de sustratos es un requerimiento específico para permitir que la célula entre en mitosis. Entre estos sustratos se incluyen como candidatos proteínas nucleares como la histona H1, cuya fosforilación ayuda a compactar los cromosomas, y láminas nucleares (pág. 489), cuya fosforilación conduce al desensamblado de la envoltura nuclear. Cdk también fosforila proteínas citoplásmicas, incluyendo las proteínas re-

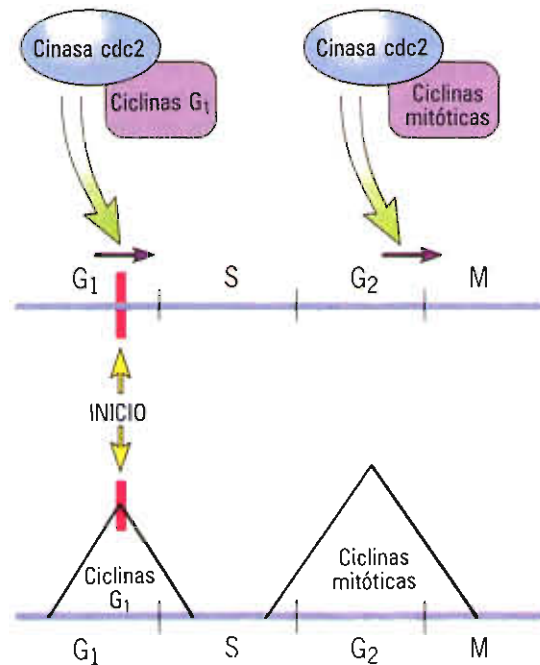


FIGURA 14-6. Modelo para la regulación del ciclo celular en levaduras. El ciclo celular está controlado principalmente en dos puntos, INICIO y la transición G_2 -M. El paso de una célula a través de cada una de estas uniones críticas requiere la activación de cdc2 cinasa por un tipo diferente de ciclina.

queridas para cambios dinámicos en la organización del citoesqueleto que caracteriza el tránsito de interfase a mitosis.

En células de levaduras, la misma Cdk (cdc2 cinasa) se encarga del paso a través de ambos puntos de compromiso, aunque acompañada de una serie sucesiva de ciclinas diferentes. El primer punto de transición, denominado *INICIO*, ocurre justo antes del final de G_1 ; el paso a través de INICIO requiere la activación de cdc2 por una o más ciclinas G_1 . El paso a través del segundo punto de compromiso, justo antes del final de G_2 , requiere la activación de cdc2 por un grupo diferente de ciclinas (ciclinas mitóticas). La concentración de cada uno de los diferentes tipos de ciclina se eleva y desciende conforme las células avanzan a través del ciclo (fig. 14-6). La concentración de cada ciclina en diferentes puntos del ciclo celular se regula ajustando las tasas de síntesis y de destrucción de la molécula de la proteína según las condiciones en ese momento. Se cree que la destrucción programada de una ciclina particular después de activar una cinasa desempeña un papel crucial para que la célula se mueva a la siguiente etapa del ciclo. Como resultado, los mutantes incapaces de descomponer la ciclina luego de iniciada la mitosis se detienen en mitosis de modo que las células no reinicien la etapa G_1 . La descomposición de las ciclinas se lleva a cabo por la vía de la ubiquitina, descrita en la página 534.

Debe hacerse notar que el enlace de una ciclina a cdc2 no es suficiente para activar por sí misma la actividad de

cinasa de la proteína antes de la mitosis. Primero debe fosforilarse un residuo de treonina crítico en la subunidad Cdk (Tre 161 en la figura 14-7), lo cual en levaduras se logra por acción de otra proteinquinasa denominada CAK (cinasa activadora de Cdk). La fosforilación de Tre 161 activa la Cdk cinasa, pero la fosforilación de los otros dos residuos (Tre 14 y Tir 15) inhibe la actividad de la misma. Otra cinasa (denominada *wee1* en levaduras) añade estos fosfatos inhibidores. Por lo tanto, como se muestra en el paso 1 de la figura 14-7, la acción de *wee1* inactiva la enzima *cdc2*. Sin embargo, la enzima inactivada puede activarse al eliminar los dos grupos fosfato inhibidores, acción efectuada por una fosfatasa llamada *cdc25* en levaduras (paso 2, figura 14-7). Por lo tanto, la fosfatasa *cdc25* y la *wee1* cinasa compiten entre sí, una estimula a *cdc2* y la otra inhibe su actividad. Versiones homólogas de cada una de estas enzimas se encuentran en células de mamíferos. Las pruebas indican que la competencia entre las actividades *wee1* y *cdc25* constituye un factor determinante crítico para iniciar la mitosis. La actividad de estas dos enzimas es regulada, a su vez, por otras cinasas y fosfatasas, de modo que el sistema que controla el ciclo celular es muy complicado. La participación de una serie de enzimas en el mecanismo para activar (e inhibir) Cdk's suministra algunos puntos específicos donde la información del interior y el exterior de la célula puede impactar el avance del ciclo celular (analizado más adelante).

Las proteínas y los procesos que participan en el control del ciclo celular son notablemente conservadas por toda la gama de células eucariotas, desde levaduras hasta plantas y animales evolutivamente más elevados. Aunque participan los mismos tipos de proteínas, cuando menos se ha implicado a ocho ciclinas diferentes y una media docena de cinasas dependientes de ciclina en el control del ciclo celular de mamíferos (a diferencia del ciclo celular de levaduras en el cual aparentemente sólo opera *cdc2* en todas las etapas). Ondas sucesivas de síntesis y descomposición de diferentes ciclinas tal vez desempeñen un papel clave en la conducción de la célula a partir de una actividad a la si-

guiente. La formación de pares entre ciclinas y Cdk es sumamente específica y sólo se observan ciertas combinaciones (fig. 14-8). Por ejemplo, un complejo formado entre ciclina E y Cdk2 es activo en la transición G_1 -S, en tanto que un complejo entre ciclina B y Cdk1 (también conocido como CDC2) es activo en la transición G_2 -M. Puesto que múltiples complejos ciclina-Cdk son activos simultáneamente y diferentes ciclinas-Cdk pueden fosforilar grupos superpuestos de sustratos de proteínas, es difícil investigar el papel específico de cada uno de los complejos.

Puntos de verificación, inhibidores de cinasas y respuestas celulares

Como se indicó antes, cuando menos hay dos puntos en el ciclo celular. La transición G_1 -S y la transición G_2 -M, donde se requiere la actividad de cinasas dependientes de ciclina (Cdk's) para impulsar el paso de las células de una fase del ciclo a la siguiente. Pruebas crecientes indican que estos puntos del ciclo celular (y probablemente otros más) sirven como **puntos de verificación** donde la célula puede detener su avance continuo si no se han llenado ciertas condiciones. Por ejemplo, en una célula de levadura, al parecer la célula debe alcanzar cierta masa en el momento de llegar al punto de verificación G_1 antes que pueda continuar a la fase S e iniciar la duplicación de DNA. De manera similar, si una célula de levadura (o de mamífero) se trata con un fármaco inhibidor de la síntesis de DNA o se expone a luz UV, que causa daño al DNA, la célula detiene su avance antes de entrar en mitosis. Esto proporciona a la célula tiempo para perfeccionar la duplicación de su DNA o reparar el daño, en vez de seguir a la siguiente etapa del ciclo celular que probablemente la conduzca a su muerte. Por lo tanto, en todos estos casos, el cese del ciclo celular es una respuesta protectora que impide a la célula participar en una actividad autodestructiva y garantizar la producción de células hijas normales.

¿Cómo puede una célula detener el avance de una etapa del ciclo celular a la siguiente? Estudios recientes revelan que las células pueden sintetizar algunas proteínas que

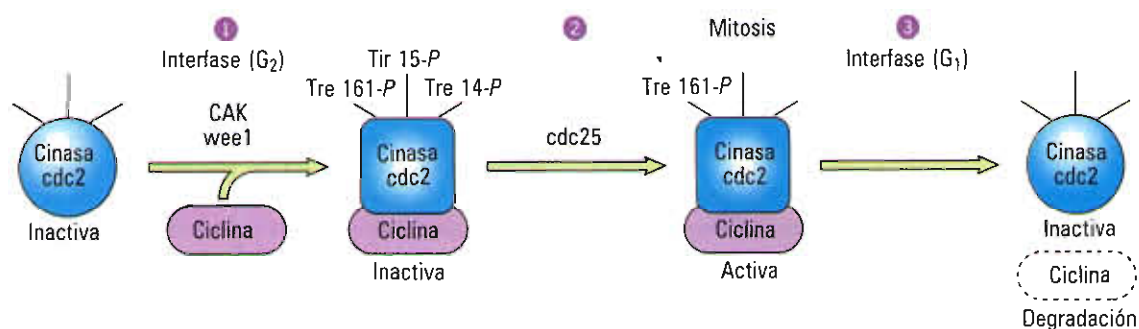


FIGURA 14-7. El avance a través del ciclo celular requiere la fosforilación y desfosforilación de ciertos residuos críticos. Durante G_2 , *cdc2* interactúa con una ciclina mitótica, pero permanece inactiva como resultado de la fosforilación de dos residuos (Tir 15 y Tre 14) por la cinasa *wee1* (paso 1). Una cinasa separada, llamada CAK, transfiere un fosfato a un tercer residuo (Tre 161), requerido para la actividad de *cdc2* tardía en el ciclo celular. La eliminación de los fosfatos inhibidores por la fosfatasa *cdc25* activa la cinasa *cdc2*, que se cree desencadena la entrada de la célula en mitosis (paso 2). Al final de la mitosis (paso 3), la ciclina se separa de *cdc2* y el grupo fosfato es eliminado de Tre 161 por acción de otra fosfatasa. Posteriormente se degrada la ciclina libre y la célula inicia otro ciclo. (Según T.R. Coleman y W.G. Dunphy, Curr. Opin. Cell Biol. 6:877, 1994.)

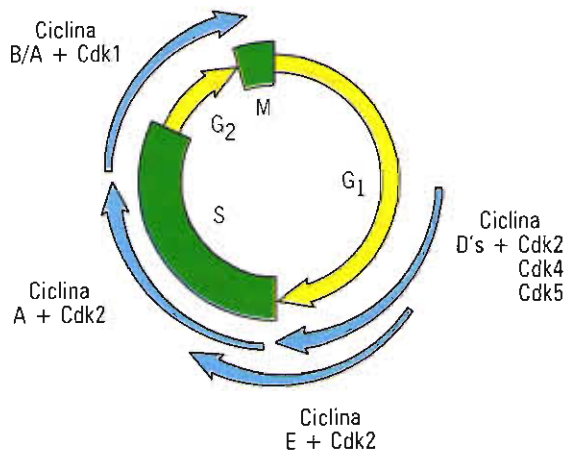


FIGURA 14-8. Combinaciones entre varias ciclinas y cinasas dependientes de ciclina en diferentes etapas del ciclo celular de mamíferos. (Según C.J. Sherr, *Cell* 73:1060, 1993; con permiso de Cell Press.)

actúan inhibiendo el avance a través del ciclo celular. Algunas de estas proteínas actúan directamente sobre el complejo Cdk-ciclina para inhibir su actividad de proteincinasa; otras al parecer pueden detener la actividad continua del mecanismo de duplicación del DNA; y todavía otras más actúan como factores de transcripción que estimulan o reprimen la transcripción de genes clave cuyos productos participan en actividades del ciclo celular. En la actualidad, las pruebas sugieren que mutaciones en algunos de estos genes causan desajustes en el mecanismo del ciclo celular que pueden conducir al desarrollo de muchos tipos diferentes de cáncer. Consideremos un ejemplo.

Casi 50% de todos los tumores humanos estudiados hasta ahora muestran mutaciones en un solo gen denominado *p53* porque su producto es un polipéptido con peso molecular de 53 kilodaltons. Esto no significa que las mutaciones en este gen causen 50% de los cánceres humanos; la mayor parte de las células cancerosas contienen algunos genes defectuosos y se cree que la deficiencia combinada de todos estos productos de gen maligniza a la célula. No obstante, las lesiones del gen *p53* claramente desempeñan un papel clave en el avance gradual de muchas células diferentes, desde una condición normal a una maligna. (Esta *progresión* se analiza con mayor detalle en el capítulo 16.) El gen *p53* se conoce como *gen supresor de tumores* porque la proteína que codifica ayuda a evitar que las células se malignicen. La proteína codificada por el gen *p53* es un factor de transcripción que activa la expresión de otros genes. Un gen controlado por la proteína *p53* codifica a un inhibidor (llamado *p21*) del complejo ciclina E-Cdk2 cuya actividad cinasa es necesaria para que una célula pase por el punto de verificación G₁ (#1, fig. 14-9). Además, *p21* puede actuar inhibiendo la duplicación en células que ya se encuentran en fase S (#2, fig. 14-9). Cuando ambas copias del gen *p53* de una célula sufren mutaciones de modo que su producto no sea funcional, la célula ya no puede producir el inhibidor *p21*. Por consiguiente, la célula ya no ejerce control por retroalimentación que impida a la célula entrar a la fase S o conti-

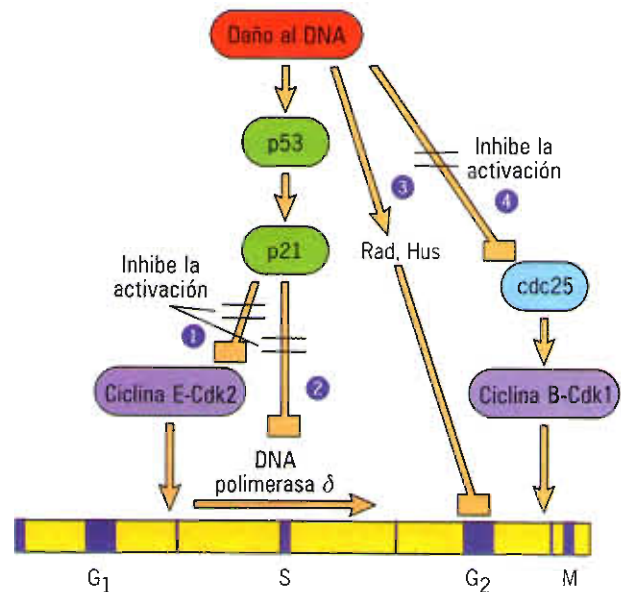


FIGURA 14-9. Efectos aparentes de daño al DNA sobre diversas actividades que ocurren como parte del ciclo celular. Según se analiza en el texto, el daño al DNA activa al gen *p53*, lo que a su vez estimula la transcripción del gen *p21* cuyo producto actúa para evitar el avance del ciclo celular tanto en G₁ (#1) como en S (#2). El daño al DNA también puede evitar la entrada de las células en mitosis por activación de los genes *rad* y *hus* (#3) y deteniendo la activación de la fosfatasa *cdc25* requerida para estimular la actividad cinasa de la ciclina B-Cdk1 (#4). (Reimpreso con permiso de *Nature*, vol. 369:520, 1994, por J. Pines. Copyright 1994, Macmillan Magazines Ltd.)

núe a través de la fase S cuando no está preparada para hacerlo.

Datos recientes indican que las células contienen algunos genes, además del *p53*, cuyos productos ejercen acción inhibitoria sobre la progresión a través del ciclo celular. Por ejemplo, en levaduras, se conocen varios genes (p. ej., *rad17* y *hus1*) cuyos productos son necesarios para detener el ciclo celular en G₂ como respuesta a la presencia de daño al DNA (#3, fig. 14-9). También se sabe que en células de mamífero el daño al DNA impide la entrada de las células a la mitosis porque interfiere con la activación del complejo ciclina B-Cdk1 (#4, fig. 14-9).

Cuando las células que han sufrido mutaciones que provocan pérdida funcional de algún producto de estos genes son irradiadas, continúan entrando en mitosis a pesar de la presencia de daño extenso al DNA causado por la radiación. Las células de pacientes humanos que sufren una rara enfermedad hereditaria llamada *ataxia-telangiectasia* (AT) muestran las mismas características. Normalmente, cuando se someten fibroblastos humanos a dosis subletales de radiación X, el inicio de la duplicación en la fase S (o inicio en los nuevos orígenes de duplicación durante la fase S) se retrasa en tanto se repara el daño. De manera similar, las células normales irradiadas con rayos X mientras se encuentran en fase G₂ retrasan su entrada en mitosis en tanto se repara el daño al DNA. Por lo contrario, las células de pacientes con AT no presentan control alguno por retroalimentación y continúan sintetizando DNA y dividiéndose

por mitosis a pesar de la presencia de DNA dañado. Esta incapacidad de inhibir el avance del ciclo celular tiene graves consecuencias; los pacientes con AT muestran una ocurrencia mucho mayor de cáncer, en particular tumores linfoides. Las alteraciones en genes que codifican inhibidores del ciclo celular probablemente desempeñen un papel en el desarrollo de gran variedad de cánceres humanos. Al mismo tiempo, el descubrimiento de estos inhibidores generó la oportunidad de sintetizar nuevos tipos de fármacos anticancerígenos que bloquean el crecimiento celular descontrolado imitando los efectos de estos inhibidores.

14-2 Fase M: mitosis y citocinesis

El nombre "mitosis" proviene del vocablo griego *mitos*, que significa "hilos". El nombre se empleó por primera vez en el decenio de 1870 para describir los cromosomas filiformes que parecían bailar alrededor de la célula justo antes de dividirse en dos. La **mitosis** es un proceso de división nuclear en el cual los cromosomas duplicados se separan con gran precisión produciendo dos núcleos, cada uno con una copia fiel de cada cromosoma.

La mitosis de ordinario se acompaña de citocinesis, proceso durante el cual la célula se separa en dos, partiendo el citoplasma en dos paquetes regularmente iguales. Las dos células hijas formadas por mitosis y citocinesis poseen un contenido genético idéntico entre sí y al de la célula madre de la cual provienen. Por lo tanto, la mitosis mantiene el número de cromosomas y genera nuevas células para crecimiento, conservación y reparación de un organismo. La mitosis puede ocurrir en células diploides o haploides. Ejemplos de esto último se encuentran en plantas gametofitas y unos cuantos animales (incluyendo abejas macho conocidas como zánganos). Más que en cualquier otra etapa del ciclo celular, la mitosis es el momento donde la célula dedica prácticamente toda su energía a una sola actividad: separar los cromosomas duplicados. Como resultado, la mitosis es un momento en el cual la mayor parte de las actividades metabólicas de la célula, incluyendo transcripción y traducción, están muy reducidas y la respuesta de la célula a los estímulos externos es escasa.

La mitosis generalmente se divide en cinco etapas (fig. 14-10): *profase*, *prometáfase*, *metáfase*, *anafase* y *telófase*, cada una caracterizada por una serie particular de acontecimientos. No debemos olvidar que cada etapa corresponde a una parte de un proceso continuo; la división de la mitosis en fases arbitrarias se efectúa sólo para facilitar el análisis y la experimentación.

Profase

Durante la primera fase de la mitosis, **profase**, los cromosomas duplicados se preparan para separarse y se ensambla el mecanismo mitótico.

Formación de cromosomas mitóticos

El núcleo de una célula en interfase contiene fibras de cromatina de longitud enorme dispersas a través de todo el

compartimiento nuclear. La cromatina de la interfase en estado extendido es ideal para el proceso de transcripción y duplicación, pero no para repartirse entre dos células hijas. Para separar los cromosomas duplicados, la célula primero los compacta en fibras más gruesas y más cortas, visibles al principio de la profase (fig. 14-11, y también fig. 14-10).

Como se describió en la sección 12-1, los cromosomas de una célula mitótica se pueden aislar como estructuras distintas en forma de bastoncillos. El examen de un cromosoma mitótico bajo el microscopio revela que cada uno de ellos se encuentra "seccionado" longitudinalmente en dos componentes distintos (fig. 14-12, *a*). Cada uno de estos miembros en forma de bastoncillo es una **cromátide**; el par de cromátides reunidas corresponde a las dos copias idénticas formadas durante la duplicación en la interfase previa (fig. 14-12, *b*). Las dos cromátides de cada cromosoma están conectadas firmemente entre sí y a sus centrómeros y más laxamente a lo largo de toda su longitud (fig. 14-12, *a*).

Como se describió en la página 497, la cromatina de una célula en interfase se organiza en fibras de casi 30 nm de diámetro. Los cromosomas mitóticos se componen de tipos similares de fibras, según se observa en el examen con microscopio electrónico de cromosomas íntegros aislados de células mitóticas (fig. 14-13, *a*). Al parecer, la transformación de un cromosoma en interfase en un cromosoma mitótico no implica grandes alteraciones en la naturaleza de la fibra de cromatina, sino más bien afecta la manera de empaquetar la fibra de cromatina. Las proteínas que median la compactación del cromosoma forman un armazón estructural o molde cuya presencia en el cromosoma mitótico se puede revelar mediante el tratamiento de cromosomas con soluciones que solubilizan las histonas y la mayor parte de las proteínas no histona. Las micrografías electrónicas de estos cromosomas así extraídos muestran que constan de un armazón residual que retiene la forma básica del cromosoma mitótico (fig. 14-13, *b*). Se encuentran asas de DNA fijas en su base a las proteínas no histona que constituyen el molde del cromosoma (mostrado con mayor aumento en la fig. 12-14, *a*). La compactación de cromosomas que ocurre durante la profase requiere la presencia de una topoisomerasa II activa, una de las principales proteínas no histona del molde del cromosoma mitótico (fig. 14-13, *c*). La topoisomerasa se enlaza a una secuencia altamente repetitiva rica en A-T cuya distribución dentro del cromosoma mitótico se revela mediante un compuesto fluorescente, la daunomicina (fig. 14-13, *d*).

El mecanismo encargado de la compactación de cromosomas todavía no está muy claro. Se cree que el proceso se desencadena por activación de una cinasa dependiente de ciclina al final de G₂, lo que conduce a la fosforilación de algunas proteínas, incluyendo los apéndices N terminal y C terminal de las moléculas de histona H1 relacionadas con el DNA de los cromosomas (fig. 12-10). Sería de esperar que la fosforilación de las histonas reduzca la atracción mutua entre las histonas y el esqueleto del DNA, lo que a su vez disminuye la fuerza de unión de las histonas al DNA. De qué manera este cambio en la interacción DNA-histona puede producir la compactación de las fibras de cromatina, todavía es tema de especulación.

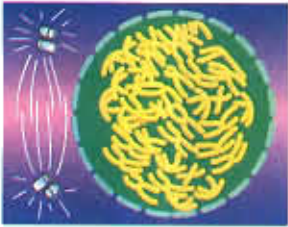
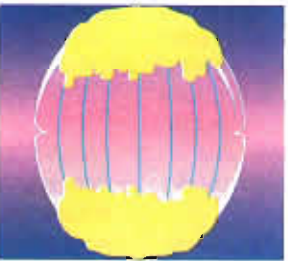
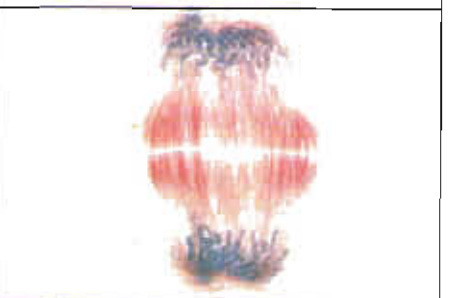
Profase		
1. El material cromosómico se condensa para formar cromosomas mitóticos compactos 2. Los cromosomas compuestos de dos cromátides se unen al centrómero 3. Se ensambla el huso mitótico 4. El citoesqueleto y la envoltura nuclear desaparecen. Complejo de Golgi y fragmento RE		
Prometáfase		
1. Los microtúbulos cromosómicos se fijan a los cinetocoros de los cromosomas 2. Los cromosomas se desplazan hacia el ecuador del huso		
Metáfase		
1. Los cromosomas se alinean a lo largo de la placa metafásica, unidos por microtúbulos cromosómicos a ambos polos		
Anafase		
1. Desdoblamiento de los centrómeros y separación de las cromátides 2. Los cromosomas se mueven hacia los polos opuestos del huso 3. Los polos del huso se separan		
Telofase		
1. Los cromosomas se agrupan en polos opuestos del huso 2. Los cromosomas se dispersan 3. Se ensambla la envoltura nuclear alrededor de los grupos de cromosomas 4. El complejo de Golgi y el RE se reconstituyen 5. Citocinesis		

FIGURA 14-10. Los pasos de la mitosis. (Micrografías de Andrew Bayer.)

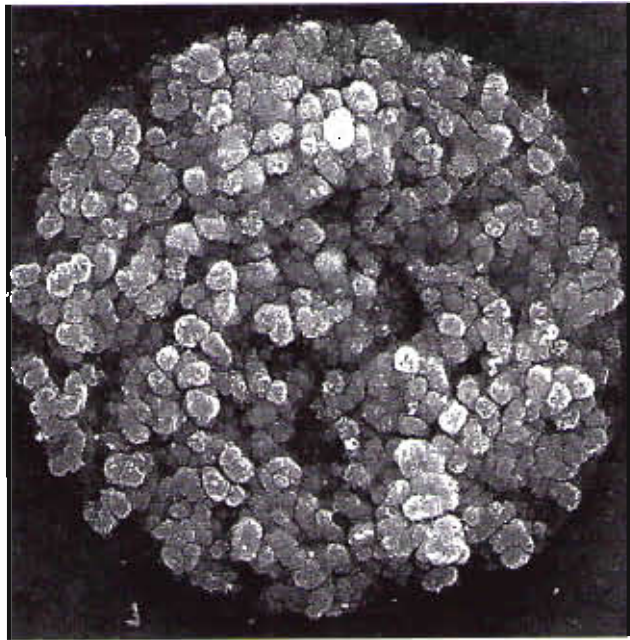
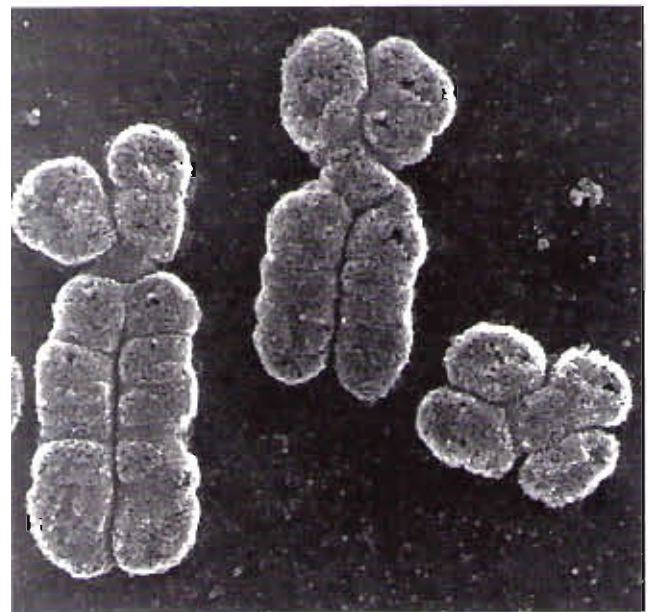


FIGURA 14-11. Los cromosomas de este núcleo en profase temprana han iniciado el proceso de compactación que los convierte en cromosomas mitóticos, cortos, semejantes a bastones que se separan en una etapa tardía de la mitosis. (Según A.T. Sumner, *Chromosoma* 100:411, 1991.)

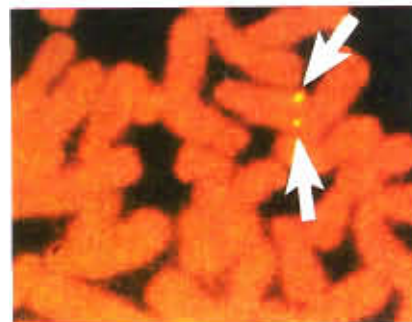
Centrómeros y cinetocoros. La marca más notable sobre un cromosoma mitótico es una indentación muy visible, o *constricción primaria*, que señala la posición del **centrómero** (fig. 14-13, a). El centrómero es el sitio donde residen las secuencias de DNA altamente repetidas (fig. 10-21) que sirven como sitio de enlace para proteínas específicas. El examen con microscopio electrónico de cortes a través del centrómero de un cromosoma mitótico revela la presencia de una estructura parecida a una placa, llamada **cinetocoro**, situada en la superficie externa del centrómero (fig. 14-14, a, b). Como veremos en breve, el cinetocoro actúa como sitio de fijación del cromosoma a los microtúbulos del huso mitótico (como en la figura 14-14, a) y también es sitio donde residen algunas proteínas motoras. Estas observaciones indican que el cinetocoro desempeña un papel clave en el movimiento de los cromosomas durante la mitosis. La estructura del cinetocoro es motivo de debate. Algunos investigadores consideran que el cinetocoro es una estructura proteinácea separada, fija a la superficie externa de la cromatina, en tanto que otros ven al cinetocoro como una región de cromatina especializada ensamblada a partir del centrómero y que contiene DNA y proteína.

La investigación de la estructura bioquímica del cinetocoro se inició en 1980 con la observación de que la sangre de pacientes con una enfermedad autoinmunitaria particular, llamada *esclerodermia*, contiene anticuerpos que reaccionan con el centrómero de los cromosomas en metafase. Los anticuerpos suministran la sonda necesaria para aislar y



(a)

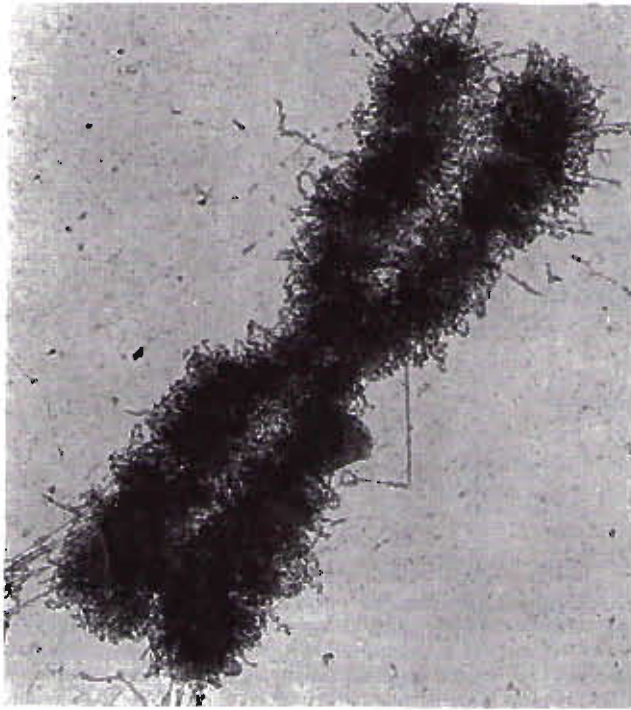
1 μm



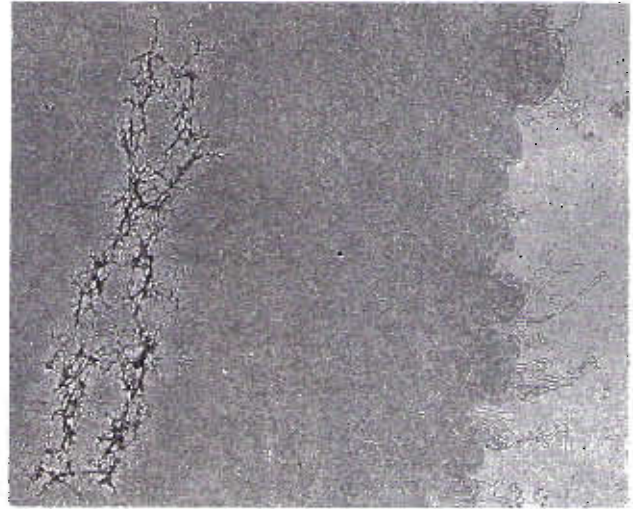
(b)

FIGURA 14-12. Cromosomas mitóticos. a) Gammagrafía electrónica de varios cromosomas humanos en metafase mostrando la unión de pares de cromátides idénticos a lo largo de su longitud y unidas firmemente al centrómero. Las cromátides no se separan entre sí hasta la anafase. b) Localización de una secuencia de DNA no repetida dentro de un conjunto de cromosomas mitóticos humanos mediante hibridación *in situ* con fluorescencia. El sitio de la secuencia de DNA está indicado por el par de puntos en posición simétrica sobre uno de los cromosomas. La presencia de la misma secuencia en el mismo sitio de ambas cromátides suministra una confirmación visual de que las cromátides se originan por duplicación durante la interfase. (a: Según A.T. Sumner, *Chromosoma* 100:415, 1991; b: cortesía de E. Viegas-Pequignot.)

caracterizar algunas proteínas restringidas a esta porción del cromosoma. Estos anticuerpos también se tiñen como sitios específicos dentro de los núcleos de células en interfase, suministrando un medio para localizar los centrómeros de cromosomas en interfase, los cuales de otro modo serían invisibles (fig. 14-15). Las proteínas a las que se enlazan estos anticuerpos al parecer son necesarias para la mitosis, puesto que la inyección de los anticuerpos en una célula bloquea el avance de la mitosis.



(a)



(b)

3 μm 

(c)



(d)

2 μm

FIGURA 14-13. Compactación de cromosomas durante la mitosis. *a)* Micrografía electrónica de una preparación con montaje total de un cromosoma mitótico humano. Se observa que la estructura se compone de una fibra nudosa de 30 nm de diámetro, similar a la observada en cromosomas en interfase. *b)* Aspecto de un cromosoma mitótico después de eliminar las histonas y la mayor parte de las proteínas no histonas. Las proteínas residuales forman un armazón del cual surgen asas de DNA (las asas de DNA se muestran con mayor claridad en la figura 12-14, *a*). *c)* Demostración de la topoisomerasa II en un cromosoma mitótico humano revelada por anticuerpos fluorescentes dirigidos contra dicha proteína. *d)* El compuesto fluorescente daunomicina se une específicamente a secuencias DNA ricas en A-T, que se cree forman los sitios de enlace para las proteínas del armazón. En este cromosoma se observa que la localización de la daunomicina (fluorescencia roja) muestra la misma distribución que la topoisomerasa del armazón. (*a*: Cortesía de Günther F. Bahr; *b*: según James R. Paulson y Ulrich K. Laemmli, *Cell* 12:820, 1977; *c-d*: según Yasushi Saitoh y Ulrich K. Laemmli, *Cell* 76:616, 1994; *b-d*: con permiso de Cell Press.)

Formación del huso mitótico

En el capítulo 9 estudiamos de qué manera se inician los microtúbulos del citoesqueleto mediante la organización de una estructura microtubular especial llamada centrosoma (pág. 337). Conforme la célula progresa y pasa por la etapa G_2 para entrar en mitosis, los microtúbulos del citoesqueleto se desensamblan antes de volver a ensamblarse para formar los componentes de una "máquina" formada por microtúbulos denominada **huso mitótico**. Para entender la formación del huso mitótico es necesario examinar el *ciclo del centrosoma* conforme avanza en coordinación con el ciclo celular (fig. 14-16, *a*).

Cuando una célula animal sale de la mitosis, posee un solo centrosoma que contiene dos centriolos situados en ángulo recto entre sí. Puesto que los cromosomas se duplican en el núcleo durante la fase S, el par de centriolos inicia su "duplicación" en el citoplasma. La formación de cada nuevo centriolo comienza con la aparición de un centriolo *hija* junto a un centriolo existente y orientado en ángulo recto respecto del mismo (fig. 14-16, *b*). El alargamiento subsecuente de los microtúbulos del centriolo *hija* lo convierte en un centriolo maduro, proceso que no concluye sino hasta que se inicia la mitosis. Aunque los centriolos madre e *hija* se orientan de manera predecible entre sí, no

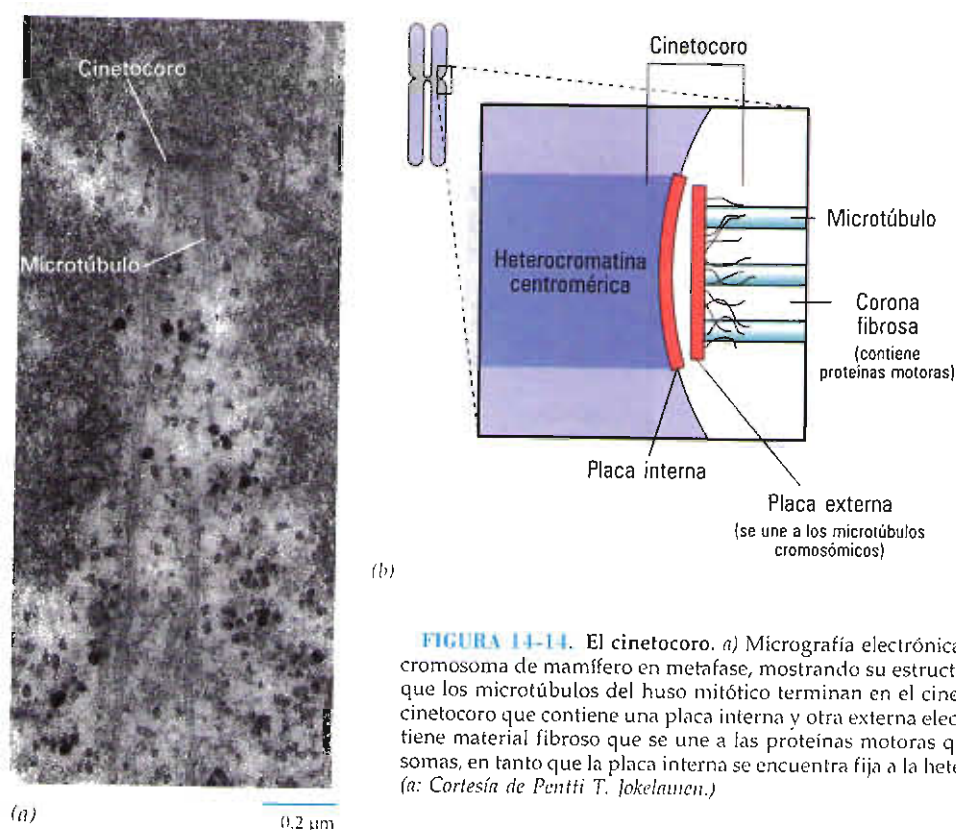


FIGURA 14-14. El cinetocoro. *a)* Micrografía electrónica de un corte a través del cinetocoro de un cromosoma de mamífero en metafase, mostrando su estructura de tres capas (trilaminar). Se puede ver que los microtúbulos del huso mitótico terminan en el cinetocoro. *b)* Representación esquemática del cinetocoro que contiene una placa interna y otra externa electrónicamente densas. La placa externa contiene material fibroso que se une a las proteínas motoras que participan en el movimiento de cromosomas, en tanto que la placa interna se encuentra fija a la heterocromatina centromérica del cromosoma. (a: Cortesía de Pentti T. Jokelaunen.)

hay conexión evidente entre ellos, ni prueba de donación alguna de material del centriolo madre a su hija.

La primera etapa en la formación del huso en una célula animal típica es la aparición de microtúbulos en disposición de "flama solar" o **áster** (figs. 14-10 y 14-17) alrededor de cada centrosoma durante la profase inicial. El examen atento de los microtúbulos astrales con el microscopio electrónico indica que no están en contacto físico directo con los microtúbulos de los centriolos. Más bien, los microtúbulos del áster, igual que sus predecesores en el citoesqueleto de la interfase (pág. 338), surgen del material pericentriolar (MPC) electrónicamente denso en la región que rodea los centriolos. Igual que el citoesqueleto, el MPC actúa como sitio de nucleación para los microtúbulos del áster que se desarrollan con sus extremos más (+) (crecimiento más rápido) alejándose del centrosoma. El incremento de la actividad iniciadora del microtúbulo del MPC durante la mitosis puede estimularse mediante fosforilación de proteínas clave por los Cdk mitóticos recién activados que controlan el avance de la célula desde G₂ hasta M (pág. 590).

El proceso de formación del áster va seguido por la separación de los centrosomas y su emigración subsecuente alrededor del núcleo hacia sitios opuestos de la célula. Puesto que los pares de centriolos se separan, los microtúbulos que sufren estiramiento entre ellos aumentan en número y se alargan (fig. 14-17). Por último, los dos centrosomas alcanzan puntos opuestos entre sí, lo que establece los dos polos del huso mitótico. Después de la mitosis, los centrosomas se distribuyen, uno para cada célula hija.

Los centriolos no son componentes esenciales en la formación del huso mitótico. Varios tipos diferentes de células animales (incluyendo el embrión temprano del ratón) carecen de centriolos en sus husos mitóticos, y la mayor parte de las plantas evolutivamente elevadas carecen por completo de centriolos. La primera demostración de la formación de un huso en células vegetales es la aparición de una zona clara que rodea al núcleo. Rápidamente aparecen microtúbulos en esta zona durante la profase, primero en disposición desorganizada y luego con organización más orientada en forma de huso. En células micóticas, como las de las levaduras y los mohos, el huso se forma por completo dentro del núcleo (fig. 14-18); los microtúbulos surgen de los cuerpos polares del huso, que se encuentran integrados a la envoltura nuclear.

Disolución de la envoltura nuclear y fragmentación de organelos citoplásmicos

Puesto que el huso mitótico se ensambla en el citoplasma y los cromosomas se compactan en el nucleoplasma, debe haber algún mecanismo que permita que los dos componentes interactúen. En la mayor parte de las células eucariotas esto es posible conforme la envoltura nuclear se desensambla al final de la profase. La **desintegración de la envoltura nuclear**, como se le denomina, es uno de los acontecimientos mejor comprendidos de la mitosis. Las láminas nucleares, principales componentes de la lámina nuclear situados en la superficie interna de la envoltura nuclear (pág. 489), están incluidas entre los sustratos de la Cdk activa-

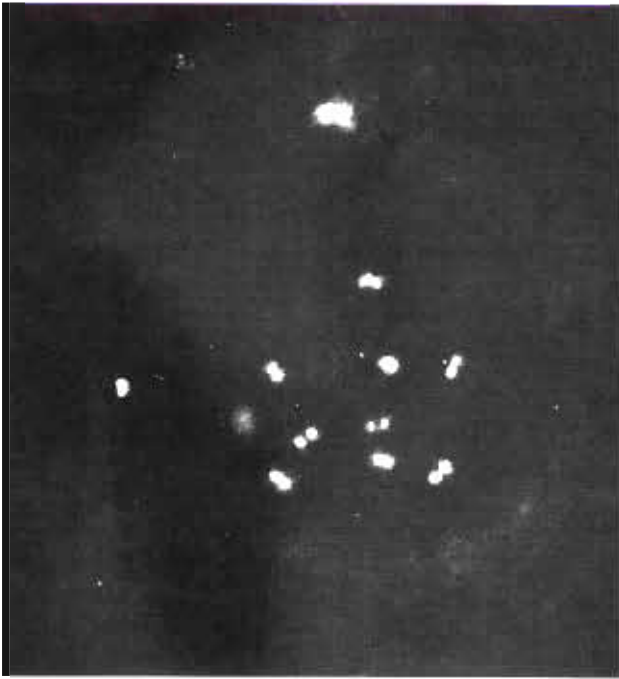


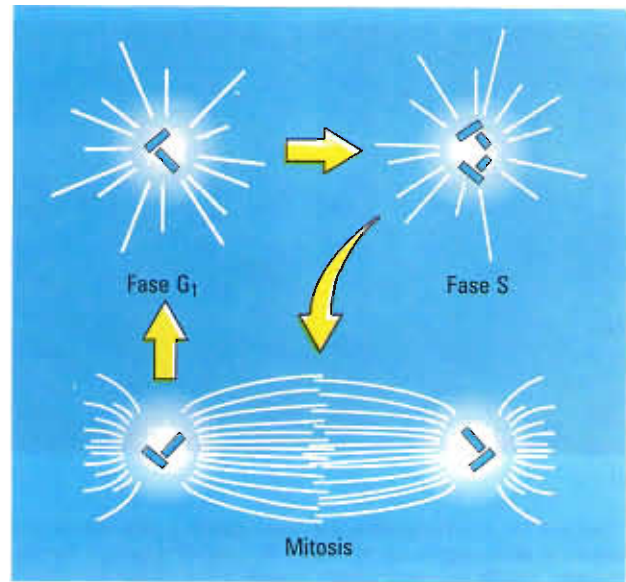
FIGURA 14-15. Localización de los cinetocoros de una célula en interfase. Micrografía con fluorescencia de una célula en fase G_2 doblemente teñida con anticuerpos fluorescentes contra material del cinetocoro y también contra el centrosoma. Se observa el centrosoma único de la célula hacia la parte de arriba de la micrografía y los cinetocoros más pequeños se notan duplicados, reflejando el hecho de que la duplicación de la cromatina ocurre durante la fase S previa. (Según S.L. Brenner y B.R. Brinkley, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 46:250, 1981.)

da al final de G_2 . El desensamblado de los filamentos que constituyen la lámina nuclear es favorecido por la fosforilación de las moléculas de la lámina por acción de las Cdk. Las propias membranas nucleares pronto son fragmentadas, al principio para formar vesículas saculares aplanadas (internas) que rodean la cromatina condensada y finalmente en una población de pequeñas vesículas esféricas (70 nm).

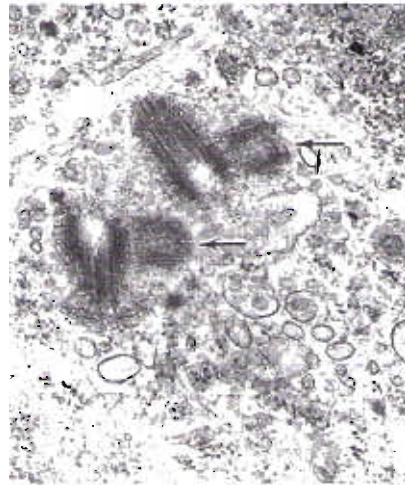
Algunos organelos membranosos del citoplasma pasan por la mitosis relativamente intactos; entre estos se incluyen mitocondrias, lisosomas, peroxisomas y los cloroplastos de una célula vegetal. Otros, como el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi, sufren fragmentación extensa para formar gran número de vesículas citoplásmicas que se dispersan a través del citoplasma. Este notable proceso de fragmentación y dispersión facilita la repartición de estas redes membranosas entre las dos células hijas.

Prometáfase

La disolución de la envoltura nuclear marca el inicio de la siguiente fase de mitosis, **prometáfase**, durante la cual se forma el huso mitótico definitivo y los cromosomas se mueven hacia una posición en el centro de la célula. Al principio de la prometáfase, los cromosomas condensados se disper-



(a)



(b)

FIGURA 14-16. Ciclo del centrosoma. a) En la fase G_1 se observa que los centrosomas contienen un solo par de centriolos orientados en ángulo recto entre sí. Los microtúbulos surgen del centrosoma con su extremo "más" de crecimiento rápido alejándose del centro organizador. Durante la fase S, cuando se duplica el DNA, los centriolos hijas comienzan a formar centriolos adyacentes al progenitor, de modo que se observan dos pares de centriolos dentro del centrosoma (véase b). Los centriolos hijas se siguen alargando durante la fase G_2 y, al principio de la mitosis, los dos centrosomas se apartan dirigiéndose a polos opuestos de la célula. Conforme los centrosomas se desplazan, organizan las fibras de los microtúbulos que constituyen el huso mitótico. b) Se observa el centrosoma de esta célula cultivada que contiene dos pares de centriolos. Los centriolos hijas más cortos están indicados por las flechas. (Según D.R. Kellog y cols., reproducido con permiso de Annual Review of Biochemistry, vol. 63, © 1994, por Annual Reviews Inc.; b: según Jerome B. Rattner y Stephanie G. Phillips, J. Cell Biol. 57:363, 1973; con permiso de Rockefeller University Press.)

sar a través del espacio que correspondía a la región nuclear. Conforme los microtúbulos del huso penetran en este espacio, los extremos libres de algunos microtúbulos que

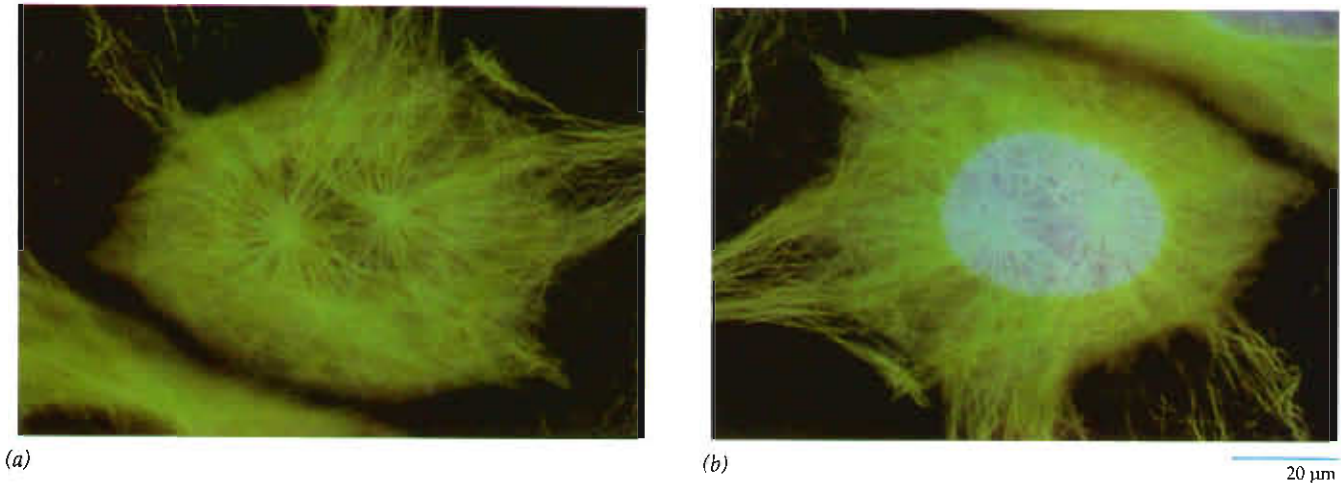


FIGURA 14-17. Formación del huso mitótico. Durante la profase, cuando los cromosomas comienzan a condensarse, los centrosomas se separan en tanto organizan los haces de microtúbulos que forman el huso mitótico. *a)* Célula cultivada de pulmón de salamandra en profase temprana, teñida con anticuerpos fluorescentes contra tubulina, que revelan la distribución de los microtúbulos celulares (verde). Los microtúbulos del huso mitótico en desarrollo emanan como estrellas a partir de dos sitios dentro de la célula. Estos sitios corresponden a las localizaciones de los dos centrómeros, que se mueven hacia polos opuestos en esta etapa de la profase. Conforme los centrosomas se separan entre sí, los microtúbulos del huso en desarrollo se alargan y aumentan en número. *b)* La misma célula mostrada en *a*, pero con doble marcado, para microtúbulo y material cromosómico (azul). Se observan los centrosomas situados justo por fuera del núcleo íntegro en esta etapa de la mitosis. (Según Jennifer C. Waters, Richard W. Cole y Conley L. Rieder, por J. Cell Biol. 122:364, 1993; con permiso de Rockefeller University Press.)

han crecido en la región adyacente al cromosoma son “capturados” por un cinetocoro. Se asume que el extremo de los microtúbulos penetra en el cuerpo del cinetocoro y, como resultado, queda firmemente unido al cromosoma. Sin embargo, datos crecientes sugieren que el cinetocoro hace contacto inicial con la superficie lateral de un microtúbulo más bien que con su extremo. Una vez que se hace el contacto, se puede observar que algunos cromosomas se desplazan activamente a lo largo de la superficie lateral del microtúbulo,

aparentemente impulsados por proteínas motoras localizadas en el cinetocoro (véase página 599). Sin embargo, pronto el cinetocoro tiende a relacionarse de manera estable con los extremos “más” de uno o más microtúbulos cromosómicos (como se muestra en la figura 14-14). En casos en que un solo cinetocoro se une a los microtúbulos a partir de ambos polos del huso, las conexiones sobre uno de los polos se desestabilizan y subsecuentemente se desconectan. Como resultado, las dos cromátides hermanas de un cromosoma mitótico se conectan a los microtúbulos que se extienden de polos opuestos.

La observación de cromosomas durante la prometáfase en células vivientes indica que los cromosomas no se mueven directamente al centro del huso, sino que oscilan hacia atrás y hacia adelante a lo largo de los microtúbulos cromosómicos con velocidad relativamente rápida (10 a 50 $\mu\text{m}/\text{min}$). El análisis de las fuerzas ejercidas sobre dichos cromosomas sugiere que cuanto más largo el microtúbulo mayor tensión ejercerá en comparación con los microtúbulos más cortos, y como resultado, el cromosoma tiende a dirigirse hacia el polo desde el cual se extiende el microtúbulo más largo. Conforme los cromosomas se mueven hacia el centro del huso mitótico a media distancia entre los polos, los microtúbulos más largos se acortan como consecuencia del desensamblado, en tanto que los microtúbulos más cortos se alargan por adición de subunidades de tubulina (fig. 14-19). Finalmente, cada cromosoma se mueve a una posición situada a lo largo de un plano en el centro del huso, de modo que los microtúbulos de cada polo son equivalentes en longitud. En la figura 14-20 se muestra el movimiento desde atrás del cromosoma a partir de un sitio periférico en dirección al centro del huso mitótico durante la prometáfase.

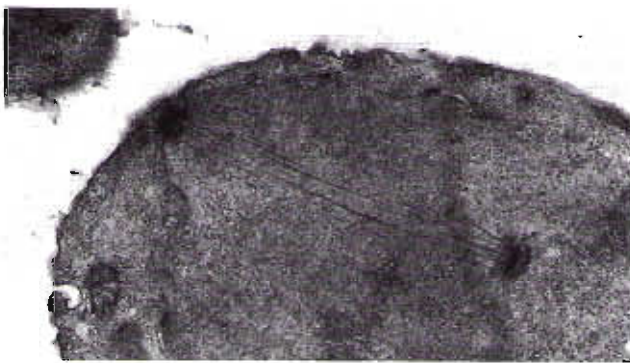


FIGURA 14-18. Uso mitótico de una célula de levadura. A diferencia de la mayor parte de las células eucariotas, en una célula de levadura en división la envoltura nuclear no se rompe al final de la profase. Las fibras del huso permanecen dentro del núcleo de la célula estiradas entre los corpúsculos polares del huso, que se pueden observar situados en extremos opuestos del núcleo celular, integrados a la envoltura nuclear. Los corpúsculos polares del huso son centros organizadores de microtúbulos (COMT) con función similar a la de los centrosomas en células animales. (Cortesía de Mark Winey.)

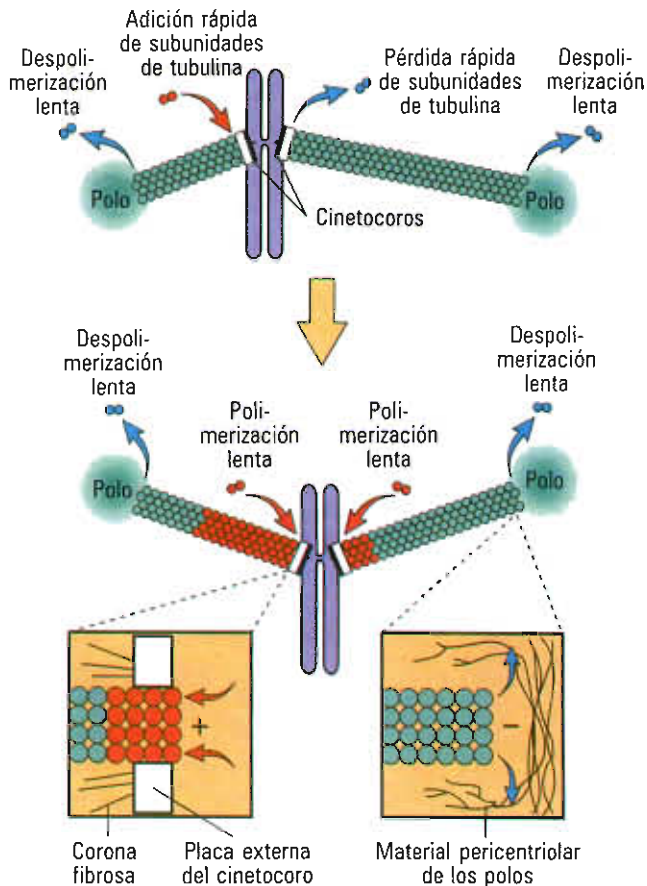


FIGURA 14-19. Conducta de los microtúbulos durante la formación de la placa metafásica. Inicialmente, el cromosoma está conectado a los microtúbulos de los polos opuestos, que son muy diferentes en longitud. Conforme la prometafase continúa, este desequilibrio se corrige como resultado del acortamiento de uno de los microtúbulos debido a la pérdida rápida de subunidades de tubulina a nivel del cinetocoro y el alargamiento de los otros microtúbulos debido a la acción rápida de subunidades de tubulina a nivel del cinetocoro. Estos cambios se superponen a una polimerización-despolimerización mucho más lenta, que ocurre continuamente y confiere a los microtúbulos del huso mitótico un carácter dinámico. Los recuadros proporcionan una vista esquemática de la adición de subunidades al cinetocoro y de la pérdida de subunidades en los polos.

Metafase

Una vez que todos los cromosomas se encuentran alineados en el ecuador del huso, con una cromátide de cada cromosoma conectada a un polo y su cromátide hermana conectada al polo opuesto, la célula ha alcanzado la etapa de **metafase** (fig. 14-21). El plano de alineación de los cromosomas durante la metafase se conoce como *placa de la metafase*. El huso mitótico de la célula en metafase tiene disposición altamente organizada de microtúbulos que es ideal para la tarea de separar los cromosomas duplicados que residen en el centro de la célula. Funcionalmente, los microtúbulos del huso de la metafase se pueden dividir en tres grupos (fig. 14-21). Todos ellos tienen la misma polaridad. Estos son:

1. **Microtúbulos astrales** que se irradian hacia afuera a partir del centrosoma en la región situada por fuera del cuerpo del huso. Probablemente ayuden a colocar en posición el aparato del huso dentro de la célula y determinen el plano de citocinesis.
2. **Microtúbulos cromosómicos** (o **cinetocoros**) que se extienden desde el centrosoma a los cinetocoros de los cromosomas. Son necesarios para el desplazamiento de los cromosomas hacia los polos durante la anafase.
3. **Microtúbulos polares** (o **interpolares**) que se extienden desde el centrosoma hasta pasar los cromosomas. Los microtúbulos polares forman una canastilla estructural que mantiene la integridad del huso. Los microtúbulos individuales de un centrosoma no se extienden a través de la hendidura completa hacia el otro polo, sino que se entrelazan con sus contrapartes del centrosoma opuesto.

Cuando se observan en cámara lenta videos o películas de la mitosis, la metafase aparece como una etapa durante la cual la célula hace una breve pausa, como si todas las actividades mitóticas súbitamente se detuvieran. El análisis experimental de la célula en metafase revela que es una impresión equivocada. Más bien, la metafase es un momento de actividad considerable, aunque hay pocas pruebas de movimiento. Por ejemplo, la metafase es uno de los puntos de verificación del ciclo celular, donde la célula de alguna manera percibe o vigila el estado de lo que ocurre para “decidir” si debe avanzar a la siguiente etapa. Este proceso de vigilancia es más notable cuando uno o más cromosomas ya se han alineado de manera apropiada en la placa metafásica. Cuando esto ocurre, como se puede comprobar experimentalmente al desplazar uno de los cromosomas para alejarlo de la placa metafásica con una aguja microscópica, la célula retrasa el inicio de la siguiente etapa hasta que el cromosoma mal colocado adopte su sitio apropiado a lo largo del ecuador del huso. Se cree que los cromosomas que no están alineados de manera apropiada en el ecuador emiten una señal reconocida por la célula como una orden para retrasar el paso hacia la mitosis. Si una célula no pudiera posponer la separación de las cromátides, elevaría mucho el riesgo de dotar a las células hijas de un número anormal de cromosomas. Es muy probable que este mecanismo de retroalimentación opere a través de un punto de verificación que requiere la actividad de la Cdk para impulsar a la célula de la metafase a la anafase, similar al que controla el paso de la célula de G₁ a S o de G₂ a la profase.

Aunque no se observa un cambio evidente en la longitud de los microtúbulos cromosómicos conforme los cromosomas se alinean sobre la placa de la metafase, los datos derivados de un gran número de estudios usando tubulina fluorescente indican que los microtúbulos existen en estado altamente dinámico. Por ejemplo, las subunidades se pierden y se añaden con rapidez en los extremos “más” de los microtúbulos cromosómicos, aunque al parecer estos extremos se encuentran unidos al cinetocoro. Así, el cinetocoro no actúa como casquete en el extremo del microtúbulo que bloquea la entrada y salida de subunidades terminales, sino más bien es un sitio de actividad dinámica. Puesto que se añaden más subunidades al extremo “más” de las que se pierden, hay adición neta de subunidades al cinetocoro.

10 μ m

FIGURA 14-20. Participación del cromosoma en la metafase y su movimiento en la placa metafásica. Esta serie de fotografías tomadas de un video muestra los movimientos de los cromosomas de una célula de pulmón de salamandra en un periodo de 100 segundos durante la prometáfase. Aunque la mayor parte de los cromosomas de la célula se encontraban casi totalmente alineados en la placa metafásica al inicio de la secuencia, uno de los cromosomas no se encuentra fijo a las fibras del uso (flecha). Los cromosomas traseros se unen al uso en B y después se desplazan en dirección al polo con velocidad variable hasta alcanzar una posición estable en F. La posición del polo está indicada por la cabeza de la flecha en A. (Según Stephen P. Alexander y Conly L. Rieder, *J. Cell Biol.* 113:807, 1991; con permiso de Rockefeller University Press.)

No obstante, los extremos polares de los microtúbulos experimentan pérdida neta, y por lo tanto se cree que las subunidades se mueven a través de los microtúbulos cromosómicos ("rueda de molino") del cinetocoro hacia el polo. En el experimento ilustrado en la figura 14-22 se indica el flujo en dirección al polo de las subunidades de tubulina en un huso mitótico.

Anafase

Las cromátides hermanas de cada cromosoma en metafase son comprimidas una contra otra a lo largo de las superficies internas, y aparentemente se mantienen juntas mediante una proteína de "pegamento" no cromosómica. La **anafase** se inicia cuando las cromátides hermanas súbitamente se separan, lo cual se acompaña de liberación de la proteína de "pegamento" dentro del citoplasma. Tal vez la anafase se

desencadene por un rápido descenso de actividad de la proteínasa dependiente de ciclina, la cual se acompaña por descomposición rápida de la ciclina mitótica. Sin embargo, aunque esto se logre, el corte de las conexiones de las cromátides hermanas no es resultado de la actividad del microtúbulo, puesto que ocurre aun después que los microtúbulos cromosómicos son despolimerizados mediante tratamiento con colquicina. La separación de las cromátides hermanas requiere la presencia de la actividad de topoisomerasa II (pág. 401), que sugiere que las moléculas de DNA de las cromátides duplicadas todavía se encuentran entrelazadas. Al parecer, esta condición es continuación de una falla de los dúplex para separarse por completo luego de la duplicación del DNA en la fase S.

Todos los cromosomas de la placa metafásica se separan de manera sincronizada y las cromátides (ahora conocidas como cromosomas, puesto que ya no se encuentran fijadas a sus duplicados) inician su migración hacia los polos (fig.

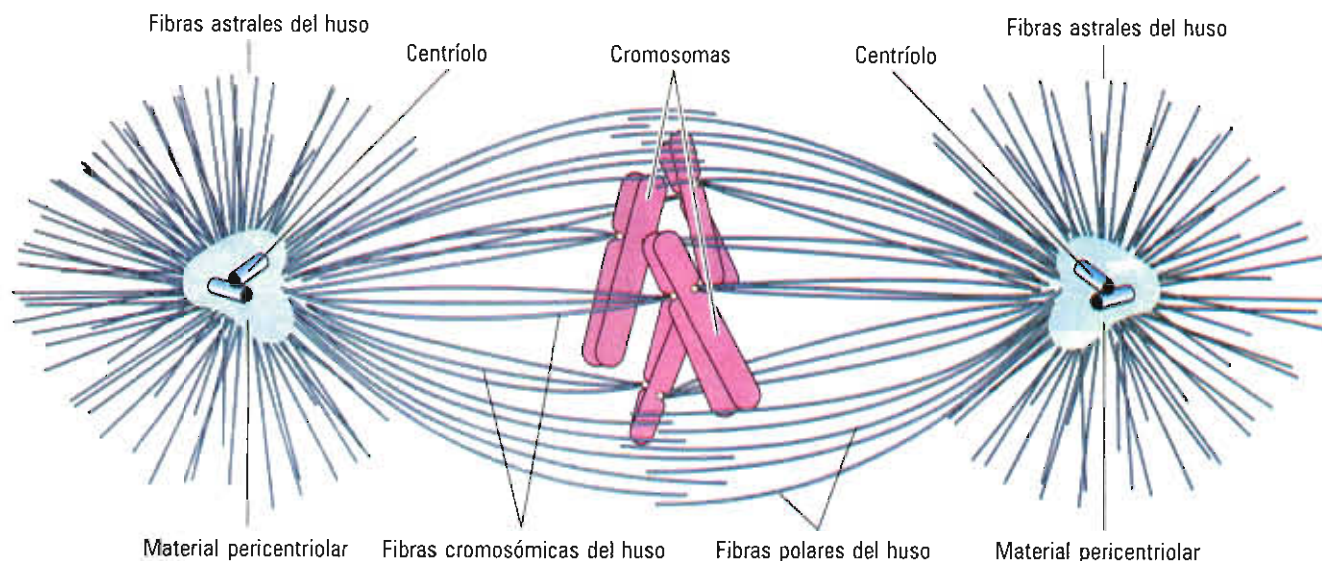


FIGURA 14-21. El huso mitótico de una célula animal. Cada polo del huso contiene un par de centriolos rodeado por material pericentriolar amorfo en el cual los microtúbulos son nucleados. Son evidentes tres tipos de fibras del huso: astrales, cromosómicas y polares, y sus funciones se describen en el texto.

14-10). El movimiento de cada cromosoma hacia un polo se acompaña del acortamiento de los microtúbulos fijos a su cinetocoro. El acortamiento se debe principalmente a la pérdida neta de subunidades a nivel del cinetocoro durante la anafase (lo que revierte la tendencia de las subunidades a añadirse a este extremo del microtúbulo durante la profase y la metafase). Conforme el cromosoma se mueve, el centrómero se observa sobre el borde delantero con los brazos del cromosoma hacia atrás (fig. 14-23).

El movimiento de los cromosomas hacia los polos se conoce como **anafase A**, para distinguirla de un movimiento simultáneo pero separado denominado **anafase B**, en la cual los dos polos del huso se separan entre sí. Recordemos que los microtúbulos polares procedentes de polos opuestos se superponen en la región del ecuador del huso (fig. 14-23). Por consiguiente, la separación de los polos se puede efectuar deslizando los microtúbulos superpuestos desde polos opuestos, uno sobre otro, en direcciones opuestas. El alargamiento del huso mitótico durante la anafase B se acompaña de la adición neta de subunidades de tubulina a los extremos "más" de los microtúbulos polares. Por lo tanto, se pueden añadir subunidades preferencialmente a microtúbulos polares y retirarlos de los microtúbulos cromosómicos al mismo tiempo en diferentes regiones de la misma célula.

El movimiento de los cromosomas hacia polos opuestos es muy lento en relación con otros tipos de movimientos celulares, y prosigue a una velocidad aproximada de $1\ \mu\text{m}$ por minuto, cifra que un investigador de mitosis ha calculado que equivale a que un viaje de Carolina del Norte a Italia, en Estados Unidos, tarde unos 14 millones de años. Puesto que las distancias de las células son pequeñas, el movimiento de los cromosomas a cualquier parte debe concluir en dos a 60 minutos. Se cree que la lenta velocidad de

movimiento de los cromosomas garantiza que los cromosomas se separen con precisión y sin enredarse. Las fuerzas que impulsan los movimientos en la anafase A y B se analizan en la siguiente sección.

Telofase

Conforme los cromosomas se acercan a sus respectivos polos, tienden a reunirse en una sola masa, lo que marca el inicio de la etapa final de la mitosis, la **telofase** (figs. 14-10 y 14-24). La telofase es la etapa durante la cual la célula retorna a su condición de interfase. La envoltura nuclear se reconstituye conforme las vesículas membranosas se unen a la superficie de los cromosomas y luego se fusionan lateralmente entre sí para formar una cubierta de doble membrana cada vez más grande. A medida que la envoltura nuclear se reconstituye, los cromosomas se dispersan cada vez más hasta que desaparecen del campo del microscopio. Entre tanto, las vesículas que formaron parte del retículo endoplásmico o del complejo de Golgi se fusionan con vesículas de composición similar para iniciar la reconstitución de estas redes citoplásmicas membranosas. La verdadera repartición del citoplasma entre las dos células hijas ocurre gracias a un proceso que analizaremos en breve. Sin embargo, primero consideraremos la naturaleza de las fuerzas necesarias para los movimientos de los cromosomas durante la mitosis.

Fuerzas requeridas para movimientos mitóticos

La mitosis es un proceso caracterizado por movimientos amplios de las principales estructuras celulares. La profase

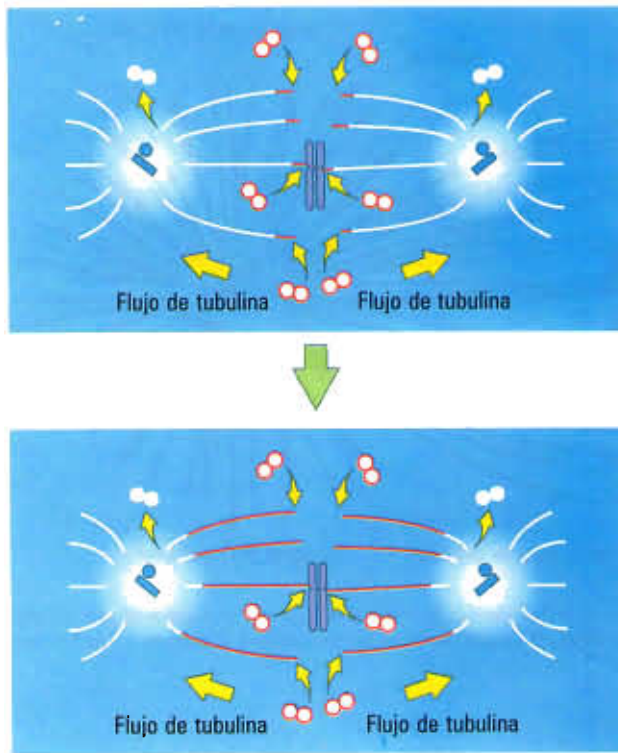


FIGURA 14-22. Flujo de tubulina a través de los microtúbulos del huso mitótico en la metafase. Aun cuando en esta etapa los microtúbulos parecen estacionarios, la inyección de subunidades de tubulina marcadas con fluorescencia indica que los componentes del huso se encuentran en estado de flujo dinámico. Las subunidades se incorporan de manera preferencial a los cinetocoros de los microtúbulos cromosómicos y los extremos ecuatoriales de los microtúbulos polares, y se pierden preferencialmente de los extremos “menos” de los microtúbulos en la región de los polos. Como resultado, se observa que las subunidades marcadas se desplazan a través de los microtúbulos conforme se prolonga el experimento.

se acompaña del movimiento de los polos del huso hacia lados opuestos de la célula, la prometáfase por el movimiento de los cromosomas hacia el ecuador del huso, la anafase A por el movimiento de los cromosomas desde el ecuador del huso hacia sus polos, y la anafase B por el alargamiento del huso. Se sabe relativamente poco acerca de las fuerzas encargadas de producir estos movimientos. En los últimos 10 años se han identificado varios motores moleculares diferentes en diferentes sitios de las células mitóticas o de especies muy diversas. Todos los motores que se cree que participan en los movimientos mitóticos son motores microtubulares, incluyendo algunos de proteínas relacionadas con diferentes cinecinas (pág. 336) y dineínas citoplásmicas. Algunos motores se mueven hacia el extremo “más” del microtúbulo, otros hacia el extremo “menos”. Las proteínas motoras se localizan en los polos del huso, a lo largo de las fibras del mismo y dentro de los cinetocoros de los cromosomas.

El papel de las proteínas motoras específicas se ha obtenido principalmente de dos tipos de estudios: 1) análisis del fenotipo de las células que carecen de proteínas motoras

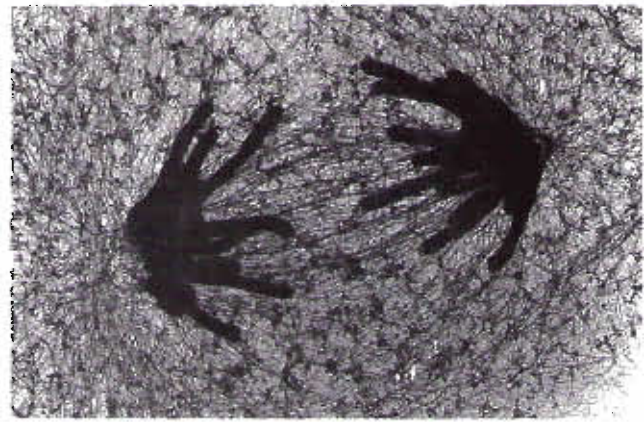


FIGURA 14-23. El huso mitótico y los cromosomas en anafase tardía. Se observan los brazos de los cromosomas tirados por los cinetocoros fijos a las fibras cromosómicas del huso en dirección hacia los respectivos polos. Las fibras cromosómicas en esta etapa tardía de la anafase son sumamente cortas y ya no aparecen entre los bordes delanteros de los cromosomas y los polos. Sin embargo, son claramente visibles las fibras polares en la zona situada entre los cromosomas que se separan. Se cree que la actividad de estas fibras polares causa la separación de los polos observada durante la anafase B. (Según J. Richard McIntosh, en *Microtubules*, J. Hyams y C.L. Lloyd, eds. Wiley, 1994.)

porque son portadoras de una mutación en un gen que codifica parte de la proteína, y 2) inyección de anticuerpos contra la proteína motora a células en diferentes etapas de la mitosis. Aunque aún es muy temprano para extraer conclusiones firmes acerca de las funciones de diferentes proteínas motoras, se pueden intentar algunas interpretaciones (fig. 14-25).

- Se cree que las proteínas motoras localizadas a lo largo de los microtúbulos polares desempeñan un papel clave para mantener los polos separados (fig. 14-25, a,b).
- Las proteínas motoras residentes en el cinetocoro probablemente sean importantes para los movimientos oscilatorios de los cromosomas durante la prometáfase (fig. 14-25, a), para mantener los cromosomas en la placa de la metafase (fig. 14-25, b) y para separar los cromosomas durante la anafase (fig. 14-25, c), según se analiza más adelante.
- Las proteínas motoras situadas a lo largo de los microtúbulos entrelazados en la región del ecuador del huso tal vez se encarguen de alargar dicho huso durante la anafase B (fig. 14-25, c).

Fuerzas requeridas para el movimiento de cromosomas en la anafase

La observación de películas detenidas de la mitosis y el examen de cortes de células en división con el microscopio electrónico condujeron a los primeros investigadores a concluir que los cromosomas eran tirados hacia los polos durante la anafase A de la misma manera que se puede arrastrar un pez al interior de un bote con un carrete y cuerda de pescar. Según este punto de vista, conocido como *hipótesis*



FIGURA 14-24. Telofase. Micrografía electrónica de un corte a través de una célula granulosa del ovario en telofase. (Según J.A. Rhodin, *Histology, Oxford*, 1974.)

de la cuerda, los microtúbulos actúan como la cuerda que tira de los cromosomas. El acortamiento observado de los microtúbulos cromosómicos ocurre conforme se desensamblan por pérdida de subunidades a nivel de los polos. Este punto de vista aparentemente lógico y no complicado de los movimientos del cromosoma se abandonó luego de varias observaciones incompatibles. Principalmente, el descubrimiento de que la despolarización de los microtúbulos cromosómicos ocurre a nivel de los cinetocoros y no en los polos.

Durante el decenio de 1980 se identificaron dineínas citoplásmicas y cinecinas relacionadas con proteínas dentro de los cinetocoros de cromosomas mitóticos, lo que indica que los cromosomas están provistos de todo el equipo motor necesario para moverse de un lugar a otro a lo largo de un microtúbulo. Durante la interfase, los anticuerpos contra dineínas muestran que la proteína se localiza en el cito-

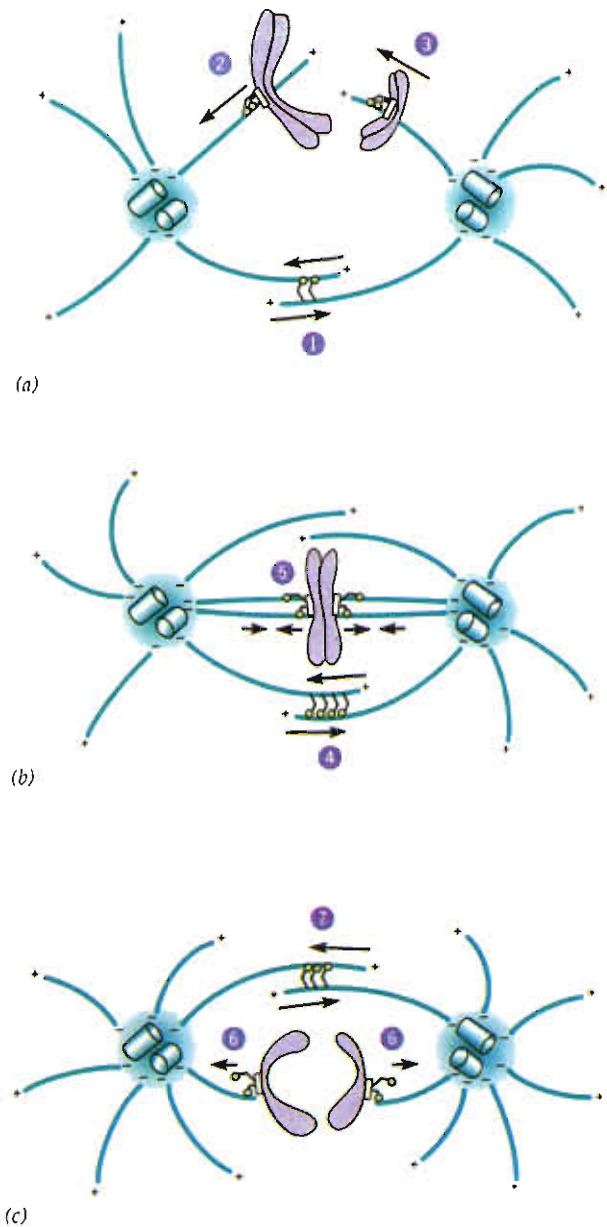


FIGURA 14-25. Actividad hipotética de las proteínas motoras durante la mitosis. a) Prometáfase. Las dos mitades del huso mitótico se desplazan separándose entre sí hacia polos opuestos; se cree que esto es resultado de la acción de motores dirigidos hacia el extremo "más" y relacionados con los microtúbulos polares (paso 1). Entre tanto, los cromosomas se fijan a los microtúbulos cromosómicos y se pueden observar oscilando hacia atrás y hacia adelante a lo largo de los microtúbulos. Estos movimientos hacia atrás y hacia adelante pueden ser resultado de motores en los extremos "menos" (paso 2) y en los extremos "más" residentes en los cinetocoros. b) Metafase. Las dos mitades del huso mantienen su separación como resultado de la actividad de motores situados en los extremos "más" relacionados con los microtúbulos polares (paso 4). Se cree que los cromosomas se mantienen en el plano ecuatorial gracias a la actividad equilibrada de proteínas motoras residentes en el cinetocoro (paso 5). c) Anafase. El movimiento de los cromosomas hacia los polos puede ser resultado de la actividad de motores en el extremo "menos" de los cinetocoros (paso 6), en tanto que la separación de los polos (anafase B) es resultado de la actividad continua de motores en el extremo "más" de los microtúbulos polares (paso 7). (Según K.E. Sawin y J.M. Scholey, *Trends Cell Biol.* 1:122, 1991.)

plasma. Sin embargo, a medida que la célula entra en mitosis la proteína motora se localiza en ambos polos del huso y en los cinetocoros. En la figura 14-26 se muestra la localización de la dineína citoplásmica en la región de los cinetocoros de una célula de mamífero en prometafase. La importancia de los motores del cinetocoro es apoyada por estudios del movimiento de cromosomas mitóticos aislados *in vitro*, capaces de movimientos rápidos sobre la superficie de los microtúbulos en ambas direcciones. Los anticuerpos para varias de estas proteínas motoras pueden bloquear el movimiento de los cromosomas luego de ser inyectados en una célula mitótica.

Aunque se cree que los motores microtubulares constituyen la fuerza más probable para el movimiento de los cromosomas, una teoría alternativa propuesta inicialmente por Shinya Inoué, del Marine Biological Laboratory at Woods Hole, todavía permanece como alternativa viable. Inoué propuso que el desensamblado de los microtúbulos cromosómicos durante la anafase no es simplemente una consecuencia de movimiento de los cromosomas, sino la causa del mismo. Inoué sugirió que el desensamblado de los microtúbulos que componen una fibra del huso pueden generar suficiente fuerza para tirar del cromosoma hacia adelante. No sería de esperar que la disolución de una fibra en un extremo suministre fuerza de tensión suficiente; sin embargo, los cálculos revelan que se requiere muy poca fuerza para mover un objeto tan pequeño como un cromosoma una distancia tan corta: tal vez 10^{-8} dinas (equivalente a 20 a 30 moléculas de ATP).

El apoyo experimental para el modelo del desensamblado proviene de estudios en los cuales los cromosomas fijos a microtúbulos sufren movimientos como resultado de la despolimerización de los microtúbulos. En la figura 14-27 se muestra un ejemplo de estos experimentos. En este caso, ocurren movimientos *in vitro* de un cromosoma enlazado a un microtúbulo (flechas) luego de diluir el medio. La dilución reduce la concentración de tubulina soluble, lo que a su vez favorece la despolimerización de los microtúbulos. Este movimiento ocurre en ausencia de ATP, que sería necesario si la fuerza fuera generada por una proteína motora. A partir de este y de otros experimentos, parecería que el desensamblado de microtúbulos por sí solo puede generar suficiente fuerza para tirar de los cromosomas a distancias considerables, pero todavía está abierto a debate si este es o no el mecanismo utilizado por las células.

Aun si el desensamblado de microtúbulos no genera las fuerzas que participan en el movimiento del cromosoma, el acortamiento de las fibras cromosómicas todavía debe ser el paso más lento en el proceso total, y por lo tanto debe controlar la *velocidad* del movimiento cromosómico. Visto de esta manera, el desensamblado de los microtúbulos actúa como *control* que mantiene lenta la velocidad de movimiento de los cromosomas a pesar de fuerzas ejercidas por motores que de otro modo provocarían que el movimiento de los cromosomas fuera mucho más rápido. Se cree que la separación lenta de los cromosomas es importante para evitar que éstos se enreden y garanticen que cada célula hija reciba una dotación completa de información genética.

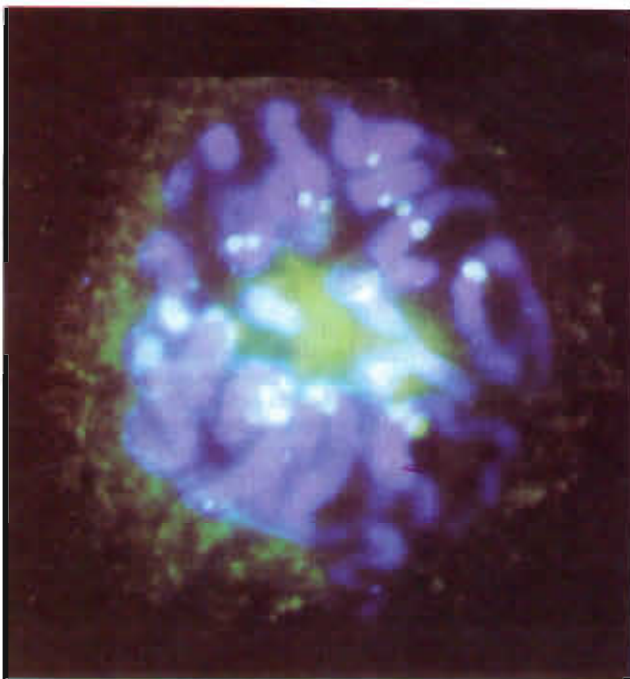


FIGURA 14-26. Localización de la dineína citoplásmica en la región del cinetocoro de cromosomas en prometafase. La dineína citoplásmica se observa como puntos de color azul brillante contra el color azul púrpura de los cromosomas condensados. (Cortesía de Curt Pfarr, J. Cell Biol. vol. 115, cover of no. 3, 1991; con permiso de Rockefeller University Press.)

Citocinesis

En tanto la mitosis efectúa la separación de los cromosomas duplicados en dos núcleos hijas, la célula se divide en dos células hijas mediante un proceso separado denominado **citocinesis**. El desdoblamiento de una célula en dos es un hecho notable que ha intrigado a los biólogos celulares durante muchos años. El primer indicio de citocinesis se observa durante la anafase tardía como indentación en la superficie de la célula dentro de una banda estrecha alrededor de la misma. Conforme avanza el tiempo, la indentación se profundiza y se convierte en un surco que rodea por completo a la célula. El plano del surco se sitúa en el mismo plano que ocupaban previamente los cromosomas de la placa de la metafase. O sea, el plano del surco es perpendicular al eje largo del huso mitótico, lo que garantiza que los dos conjuntos de cromosomas se separen finalmente en dos células. El surco continúa profundizándose hasta que las superficies opuestas hacen contacto en el centro de la célula y la célula se separa en dos (fig. 14-28).

Nuestra idea actual del mecanismo encargado de la citocinesis proviene de una proposición hecha por Douglas Marsland en el decenio de 1950, conocida como la **teoría del anillo contráctil** (fig. 14-29). Marsland propuso que la fuerza necesaria para separar una célula se genera en una delgada banda de citoplasma contráctil justo por debajo de la membrana plasmática, o sea la *corteza*, en la región del

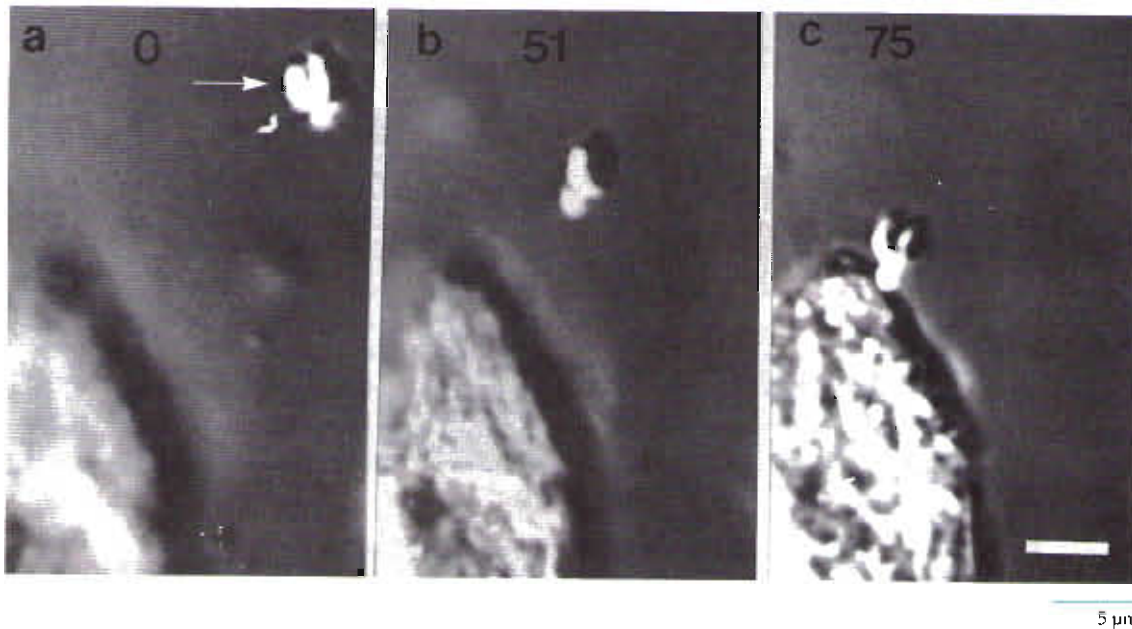


FIGURA 14-27. Demostración experimental de que el desensamblado del microtúbulo puede desplazar *in vitro* a los cromosomas fijos. La estructura situada en la parte inferior izquierda es el residuo de la lisis de un protozoo encerrado dentro de una cámara llena de líquido. En presencia de tubulina se usaron los corpúsculos basales de la superficie del protozoo como sitios para iniciar los microtúbulos, que crecieron hacia afuera dentro del medio. Una vez formados los microtúbulos, se introdujeron cromosomas mitóticos condensados en la cámara y se les permitió unirse a los extremos de los microtúbulos. La concentración de tubulina soluble dentro de la cámara fue disminuida por dilución, provocando la despolimerización de los microtúbulos. Como se muestra en esta secuencia de video, los microtúbulos se encogieron y el encogimiento fue acompañado por el movimiento del cromosoma fijo (flechas). Barra igual a 5 µm. (Según Martine Coue, Vivian A. Lambillo y J. Richard McIntosh, *J. Cell Biol.* 112:1169, 1991; con permiso de Rockefeller University Press.)

propio surco. El examen microscópico de la corteza situada por debajo del surco de una célula en división revela la presencia de numerosos filamentos de actina (figs. 14-30, *a*,

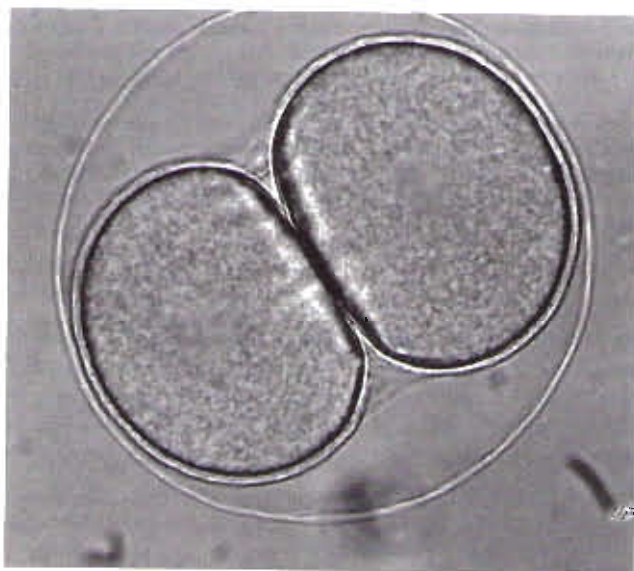


FIGURA 14-28. División del huevo de un erizo de mar en dos células por citocinesis. (Cortesía de Trygve Gustafson.)

y 14-31, *a*). Utilizando técnicas ópticas especializadas, se observa que los filamentos de actina están alineados paralelamente al surco de separación (fig. 14-30, *b*).

Interpuestos entre los filamentos de actina se encuentra un pequeño número de filamentos cortos bipolares de miosina. Estos filamentos se componen de miosina II, según se demuestra por su enlace a anticuerpos antimiosina II (fig. 14-31, *b*). La importancia de la miosina II en la citocinesis es evidente por el hecho de que los anticuerpos antimiosina II provocan el cese inmediato de la citocinesis cuando se inyectan a una célula en división (fig. 14-31, *c*), y a partir de estudios que muestran que las células que carecen de un gen de miosina II funcional pueden efectuar la división nuclear por mitosis, pero no se pueden dividir en células hijas. Estas diferentes observaciones demuestran que la fuerza generadora del mecanismo que opera durante la citocinesis es similar a la contracción de células musculares basada en actina-miosina. En tanto que el deslizamiento de los filamentos de actina de una célula muscular provoca el acortamiento de la fibra muscular, el deslizamiento de los filamentos del anillo contráctil tira de la corteza y de la membrana plasmática a la cual está fija en el centro de la célula.

Uno de los aspectos más notables del anillo cortical es la rapidez con la cual se ensambla antes de la citocinesis y se desmantela una vez concluida ésta. Los filamentos de actina y miosina que aparecen en el anillo contráctil se componen de las mismas subunidades previamente presentes como parte del citoesqueleto de la célula en interfase. El

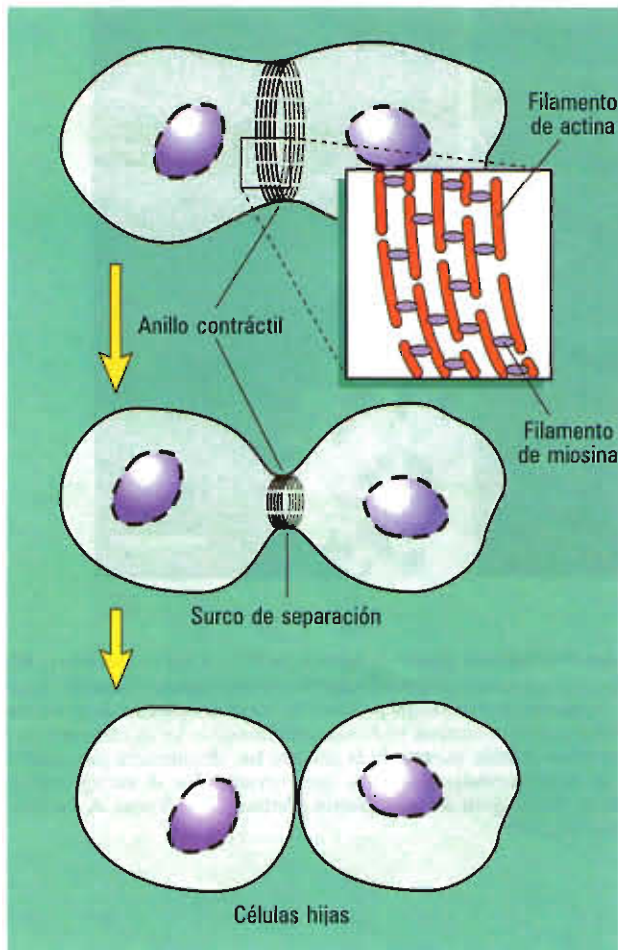
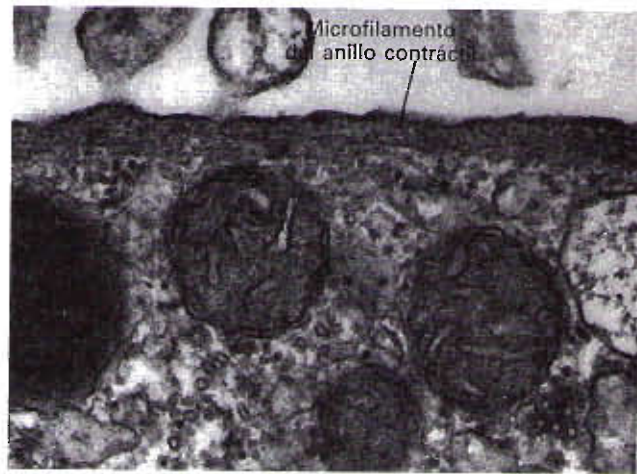


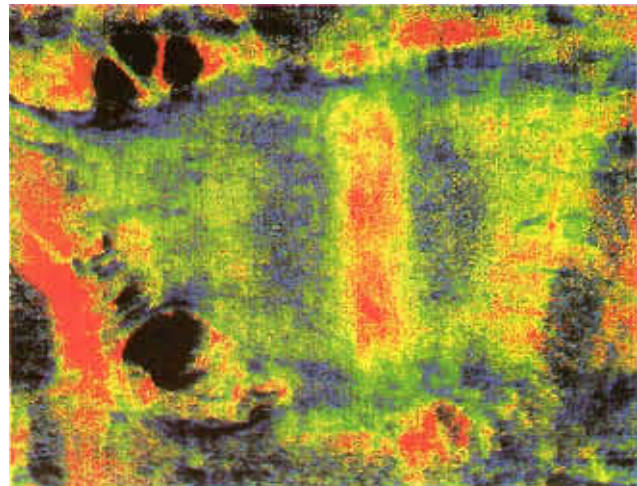
FIGURA 14-29. Formación y operación del anillo contráctil en la citocinesis. Los filamentos de actina se ensamblan para formar un anillo en el ecuador de las células. La contracción del anillo, que requiere la acción de miosina, provoca la formación de un surco que separa la célula en dos.

anillo contráctil siempre se forma en un plano situado a la mitad de la distancia entre los polos del huso, aun si alguno de estos polos se desplaza experimentalmente mediante una microaguja introducida en la célula. Los estudios de este tipo sugieren que el plano en el cual se ensambla el anillo contráctil es determinado por una señal que proviene de los polos del huso. Como se indica en los experimentos descritos a continuación, se cree que la señal ejerce su acción antes del inicio de la metafase.

Aunque mitosis y citocinesis normalmente están en estrecha vinculación, es posible un sorprendente grado de disociación. Los experimentos demuestran que la formación del surco puede ocurrir luego de eliminar o destruir por completo el aparato mitótico, pero sólo si esto se efectúa después del inicio de la metafase. Por ejemplo, todo el aparato mitótico se puede succionar hacia afuera de una célula en anafase, mucho antes de la formación del surco, y la citocinesis ocurrirá en el mismo sitio que habría tenido lugar si la célula no se hubiera alterado. La figura 14-32 mues-



(a)



(b)

FIGURA 14-30. Filamentos de actina del anillo contráctil. a) Micrografía electrónica del corte de un huevo de erizo de mar en desdoblamiento paralelo al surco y, por lo tanto, paralelo a los microfilamentos del anillo contráctil. b) Imagen generada por computadora que muestra la orientación de los filamentos de actina en una célula de roedor en división. La barra de color amarillo rojo brillante, en la parte media de la imagen, indica la alineación preferencial de los filamentos de actina paralela al surco de separación. (a: Cortesía de Thomas E. Schroeder; b: según Douglas J. Fishkind y Yu-Li Wang, *J. Cell Biol.* vol. 123, cover of no. 4, 1993; con permiso de Rockefeller University Press.)

tra el surco en una célula en la cual se han colocado grandes gotas de aceite durante la anafase antes de iniciarse la citocinesis. En este caso, la gota de aceite desplaza por completo al huso mitótico, pero el surco se forma a lo largo del mismo plano que se habría formado si no se hubiera inyectado el aceite.

Citocinesis en células vegetales: formación de la placa celular

Las células vegetales, encerradas por una pared celular inextensible, dividen su contenido citoplásmico en células hijas

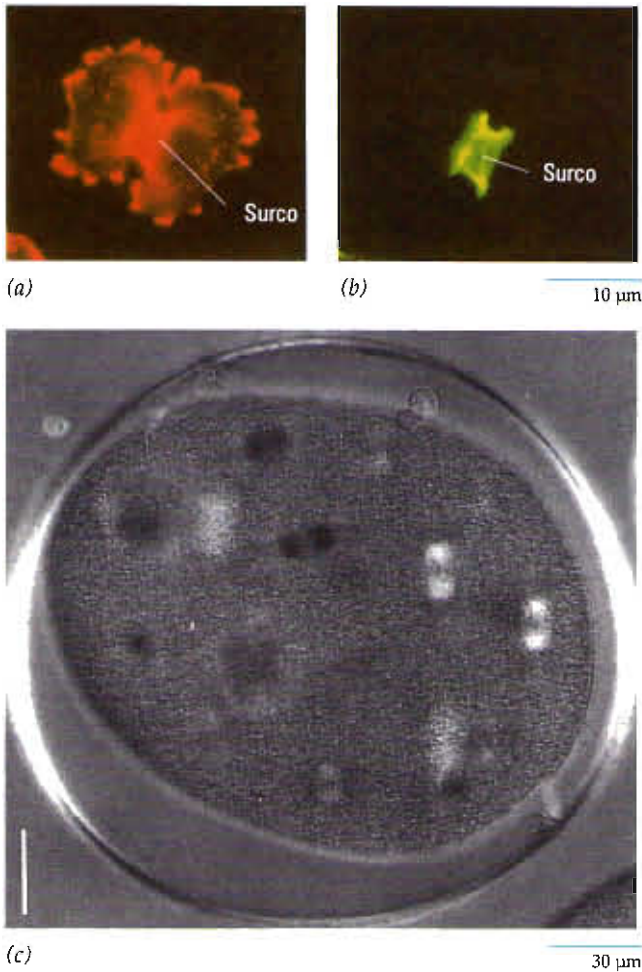


FIGURA 14-31. Demostración experimental de la importancia de la miosina en la citocinesis. *a-b*) Localización de la actina y la miosina II en la ameba *Dictyostelium* durante la citocinesis, según se puede demostrar con doble tinción inmunofluorescente. *a*) Los filamentos de actina (color naranja) se localizan en el surco de separación y en la periferia de la célula, donde desempeña un papel clave en el movimiento celular (sección 9-7). *b*) Miosina II (color verde), localizada en el surco de separación, como parte del anillo contráctil que rodea al ecuador. *c*) Huevo de una estrella de mar a la cual se le inyectó un anticuerpo contra la miosina de la estrella de mar según se observa bajo luz polarizada (los husos mitóticos aparecen más brillantes o más oscuros que el fondo debido a la presencia de microtúbulos orientados, sección 17-1). La citocinesis está completamente suprimida por los anticuerpos, pero la mitosis (revelada por los husos mitóticos) continúa sin ser afectada. (*a*: Cortesía de Yoshio Fukui; *b*: según Daniel P. Kichart, Issei Mabuchi y Shin'ya Inoué, *J. Cell Biol.* 94:167, 1982; con permiso de Rockefeller University Press.)

por un mecanismo de tipo muy diferente. En vez de contraer a la célula mediante un surco que avanza hacia adentro a partir de la superficie celular externa, las células vegetales construyen una membrana celular y una pared celular denominada **placa celular**, que crece hacia afuera de las paredes laterales existentes. La construcción de una nueva placa celular se puede seguir si se coordinan observaciones sobre células vivientes con el microscopio de luz y células ya fijadas en el microscopio electrónico. La célula vegetal

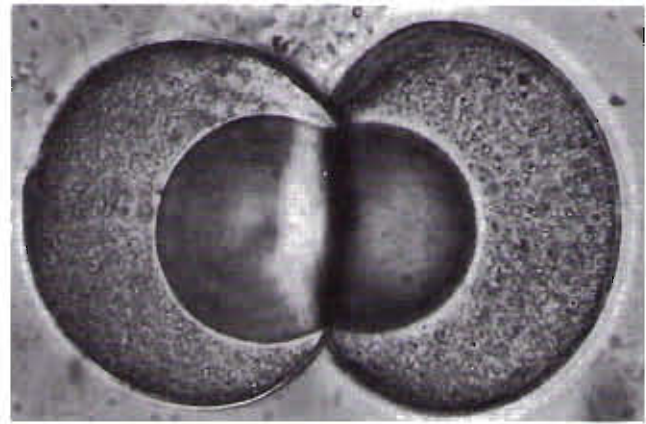


FIGURA 14-32. Demostración experimental de que la citocinesis no depende de un huso mitótico intacto. La microinyección de una gota de aceite en este huevo de erizo de mar en anafase trastorna por completo el aparato, pero no tiene efecto sobre la posición de la citocinesis en curso. (Cortesía de Y. Hiramoto.)

mejor estudiada es la de una endosperma del lirio sanguíneo africano *Haemanthus*, que se puede aislar desde la semilla y cultivar *in vitro* durante una división celular adicional.

El primer signo de formación de una placa celular se observa en la anafase tardía-telofase inicial con la aparición de un material denso regularmente alineado en el plano ecuatorial de la placa previa de la metafase. En las primeras etapas, este material se restringe a la región central de la célula. El examen con microscopio electrónico de esta región, llamada **fragmoplasto** (fig. 14-33, *a*), muestra que consta de grupos de microtúbulos entrelazados orientados perpendicularmente a la futura placa, juntos mediante algún tipo de material electrónicamente denso acompañante. Los microtúbulos de los grupos tal vez se originen a partir de residuos del huso mitótico y también por la formación de nuevas subunidades de tubulina. Con el tiempo, el material denso de los grupos de microtúbulos se alinea mejor en el plano que corresponde a la silueta previa del plano de la futura pared celular. Después de la formación del fragmoplasto, las vesículas pequeñas se mueven hacia dicha región, quizá transportadas por los propios microtúbulos. Las vesículas que se originan a partir del sistema RE-Golgi, contienen el material para construir la placa celular, precursora de la pared celular madura. Conforme las vesículas se desplazan a esa posición en el plano ya establecido del fragmoplasto, se fusionan entre sí para formar largas cadenas (fig. 14-33, *b*). La membrana de las vesículas se convierte en la membrana plasmática de las dos células hijas adyacentes, en tanto que el material dentro de las vesículas se convierte en la placa celular interpuesta. El proceso inicia cerca del centro de la célula y luego avanza lateralmente a medida que los grupos de microtúbulos y vesículas forman las paredes laterales de la placa celular creciente. La placa celular se extiende con rapidez hasta alcanzar las paredes ya establecidas de la célula. Una vez que la formación de la placa celular concluye, se añaden materiales adicionales para producir la pared celular madura.

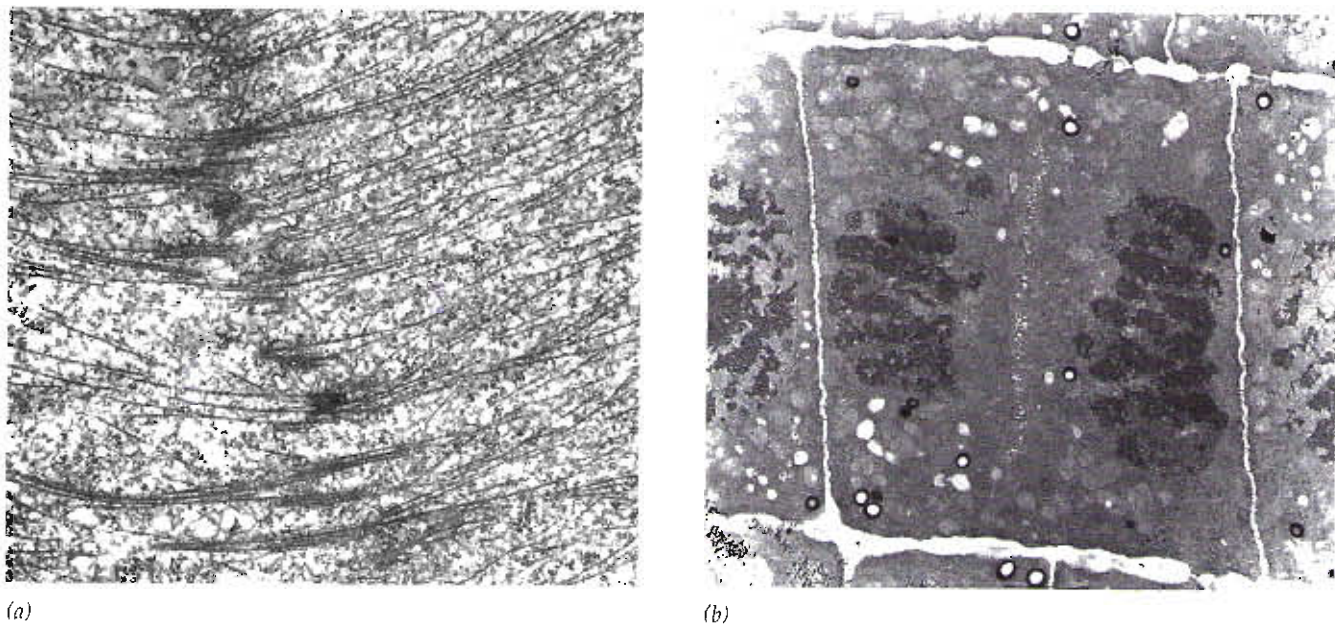


FIGURA 14-33. Formación de una placa celular entre dos células vegetales hijas durante la citocinesis. *a)* Fragmaoplasto que muestra los haces de microtúbulos que cruzan el centro de la célula en disposición superpuesta. Entre cada haz se puede notar una región más densa que regularmente cae en el plano de la futura placa celular. *b)* Micrografía de menor resolución en etapa tardía. Las vesículas de secreción procedentes de los complejos de Golgi cercanos se encuentran alineadas a lo largo del plano ecuatorial y comienzan a fusionarse entre sí. La membrana de las vesículas forma la membrana plasmática de las dos células hijas y el contenido de las vesículas proporciona el material que forma la placa celular para separar a las células. Más tarde, otras vesículas de secreción suministran material adicional para construir la pared celular. (*a*: Según P.K. Hepler y W.T. Jackson, J. Cell Biol. 38:442, 1968; con permiso de Rockefeller University Press; *b*: David Phillips/Photo Researchers.)

14-3 Meiosis

La producción de un descendiente por reproducción sexual incluye la unión de dos células, cada una con un juego completo de cromosomas. Como se analiza en el capítulo 10, la duplicación del número de cromosomas que ocurre durante la fertilización se compensa por una reducción equivalente del número de cromosomas en una etapa previa a la formación de los gametos. **Meiosis** es el proceso durante el cual el número de cromosomas se reduce de modo que se forman células que sólo contienen un miembro de cada par de cromosomas homólogos. Así, la meiosis garantiza la producción de una fase haploide en el ciclo de vida, y la fertilización asegura una fase diploide. Sin meiosis, la reproducción sexual sería imposible.

A diferencia de la mitosis, en la cual los cromosomas se duplican y luego se dividen entre dos núcleos hijas en una sola división, la duplicación de los cromosomas antes de la meiosis va seguida por *dos* divisiones en secuencia que distribuyen los cromosomas entre cuatro núcleos (fig. 14-34). Para asegurar que cada núcleo hija formado durante la meiosis posea un miembro de cada par de cromosomas homólogos, ocurre un elaborado proceso de formación de pares de cromosomas que no tienen contraparte en la mitosis. A medida que se forman los pares, los cromosomas homólogos participan en un proceso de recombinación genética que produce cromosomas con nuevas combinaciones de alelos maternos y paternos.

El examen de varios eucariotes indica que hay notables diferencias respecto de la etapa del ciclo vital durante la cual ocurre la meiosis y en la duración de la fase haploide. Con esta base se pueden identificar los tres grupos siguientes (fig. 14-35):

1. **Meiosis terminal o gamética.** En este grupo, que incluye todos los animales multicelulares, muchos protozoarios, y unas pocas plantas inferiores, las divisiones meióticas están íntimamente relacionadas con la formación de los gametos (fig. 14-35, izquierda). Por ejemplo, en vertebrados macho (fig. 14-36, *a*), la meiosis ocurre justo antes de la diferenciación de los espermatozoides. La *espermatogonia* se convierte en *espermatocitos primarios*, que después sufren dos divisiones meióticas para formar cuatro *espermátides* relativamente indiferenciadas, cada una de las cuales sufre una transformación compleja para convertirse en espermatozoide altamente especializado. En los vertebrados hembra (fig. 14-36, *b*), la *oogonia* se convierte en *oocitos primarios*, que después entran en profase meiótica prolongada. Durante esta profase, el oocito primario crece y se llena de yema y otros materiales. Sólo después de esta diferenciación el oocito está completo (o sea, el oocito alcanza esencialmente el mismo estado que cuando se fertiliza) y puede ocurrir la división meiótica. Los huevos de vertebrados típicamente se fertilizan en una etapa anterior a la conclusión de la meiosis (de ordinario en la

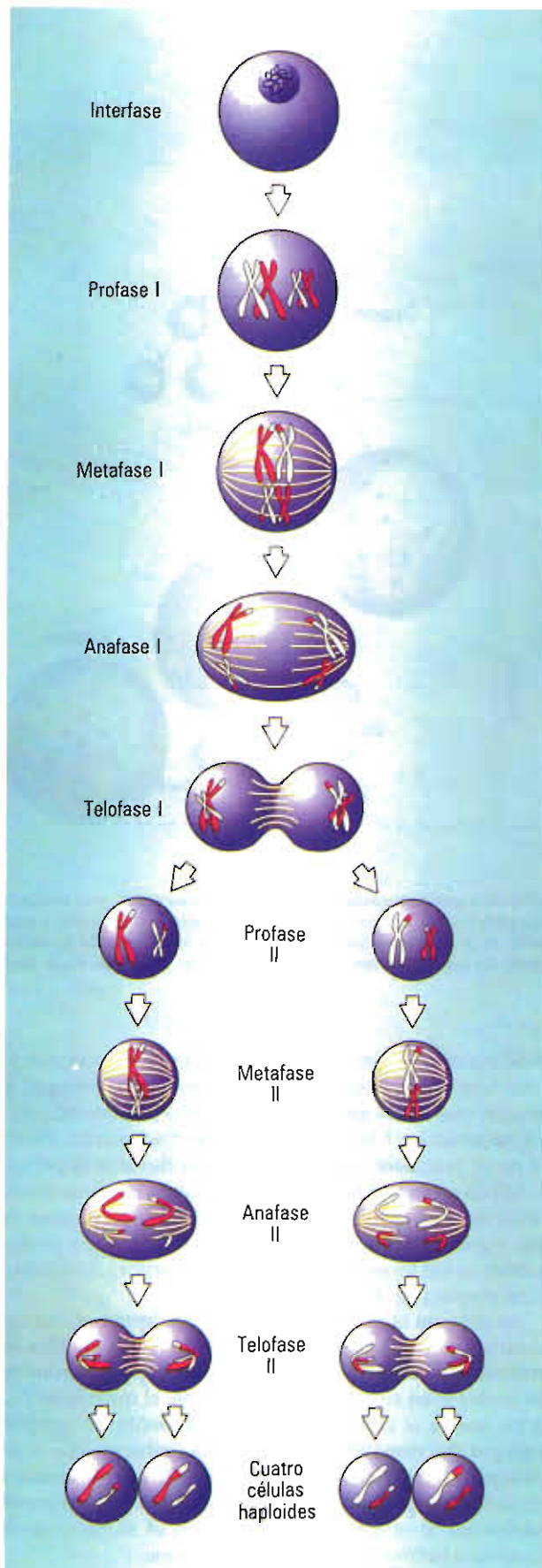
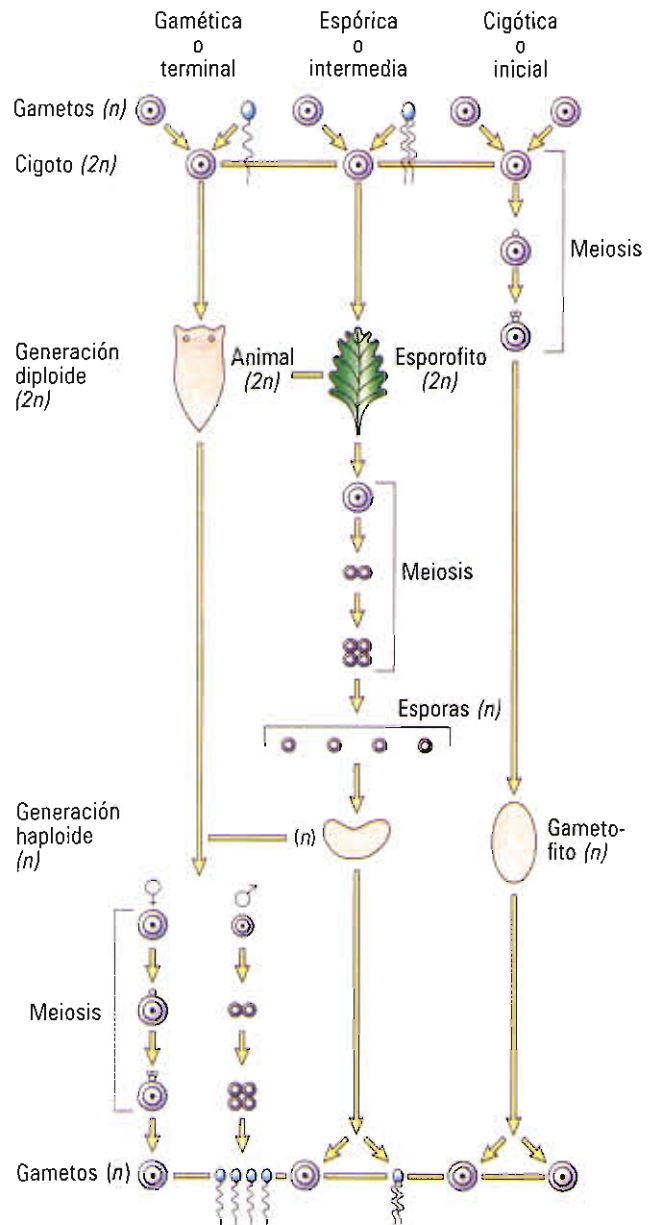


FIGURA 14-34. Etapas de la meiosis.

FIGURA 14-35. Comparación de los tres principales grupos de organismos con base en la etapa dentro del ciclo vital donde ocurre la meiosis y la duración de la fase haploide. (Adaptado de E.B. Wilson, *The Cell in Development and Heredity*, 3a. ed., 1925; reimpresso con permiso de Macmillan Publishing Co., Inc.)

metafase II). La meiosis concluye después de la fertilización, en tanto el espermatozoide reside en el citoplasma del óvulo.

2. *Meiosis inicial o cigótica*. En este grupo, que incluye sólo unas pocas algas, protozoarios y hongos, las divisiones meióticas ocurren justo después de la fertilización (fig. 14-35, derecha). Por consiguiente, todas las células son haploides; la etapa diploide del ciclo vital se restringe a un breve periodo después de la fertilización.
3. *Meiosis intermedia o por esporas*. En este grupo, que incluye todas las plantas evolutivamente elevadas, las

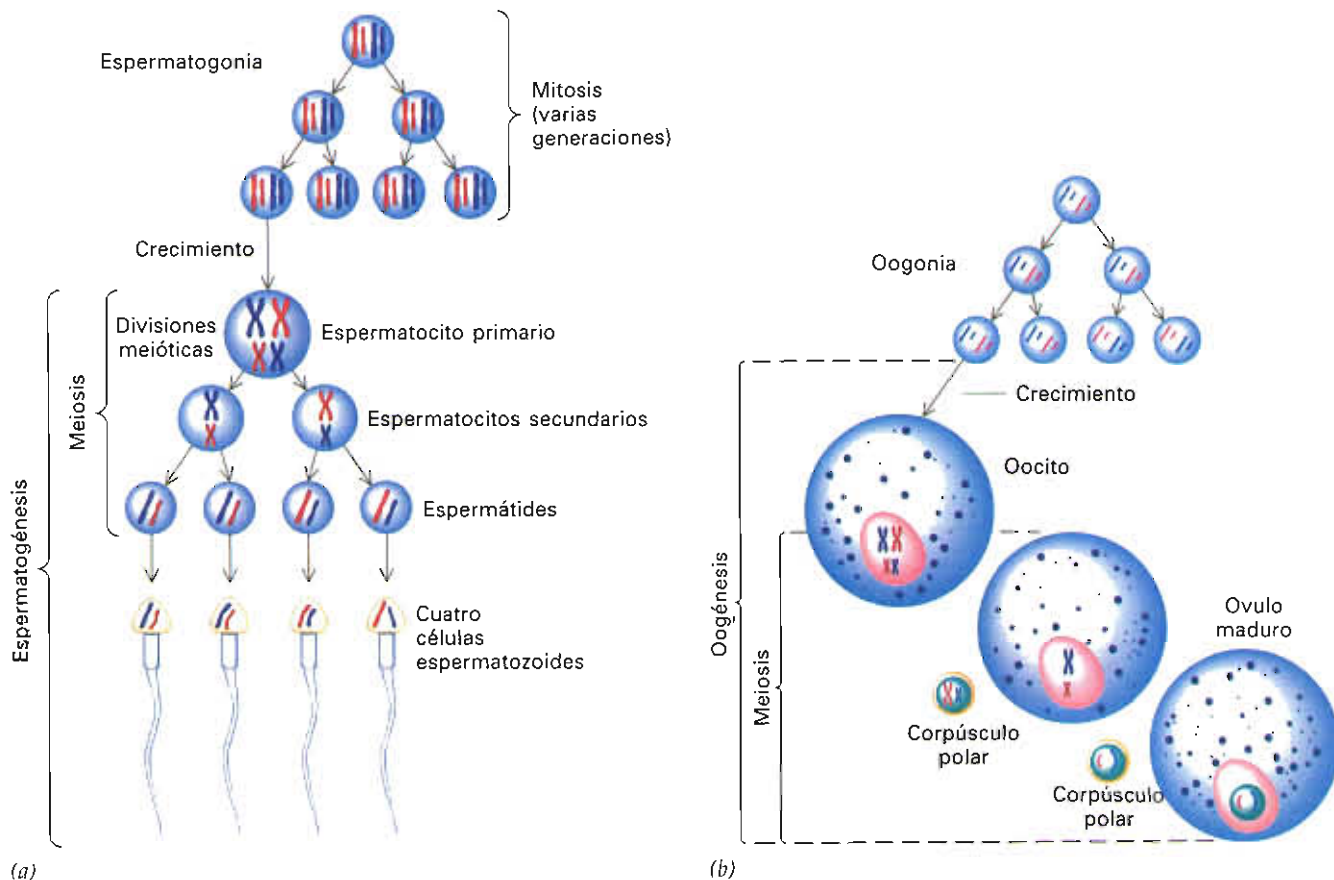


FIGURA 14-36. Etapas de la gametogénesis: comparación entre la formación de espermatozoides y óvulos. En ambos sexos, una población relativamente pequeña de células germinales primordiales prolifera por mitosis para formar una población (espermatogonia u oogonia) a partir de las cuales se diferencian los gametos. En el macho (a) ocurre la meiosis antes de la diferenciación, en tanto que en la hembra (b) la meiosis ocurre después de la diferenciación. Cada espermatocito primario generalmente da lugar a cuatro gametos viables, en tanto que cada oocito primario sólo forma un huevo fertilizable y dos o tres corpúsculos polares.

divisiones meióticas tienen lugar en una etapa no relacionada con la formación de gametos ni con la fertilización (fig. 14-35, centro). Si consideramos que el ciclo de vida se inicia con la unión de un gameto masculino (célula del polen) y un gameto femenino (el óvulo), el cigoto diploide formado sufre mitosis y se desarrolla para dar un **esporofito** diploide. En alguna etapa del desarrollo del esporofito ocurre la **esporogénesis** (que incluye la meiosis), produciendo esporas que germinan directamente para formar un **gametofito** haploide. El gametofito puede ser una etapa independiente o, como en el caso de las plantas con semilla, una pequeña estructura retenida dentro de los óvulos. Cualquiera que sea el caso, los gametos se producen en el gametofito haploide por *mitosis*.

Etapas de la meiosis

Como en toda división celular, el preludio de la meiosis incluye la duplicación del DNA. La fase S premeiótica generalmente se prolonga más que la fase S premitótica. La profase de la primera división meiótica (o sea, profase I) se

considera extraordinariamente alargada cuando se compara con la profase de una división mitótica. Por ejemplo, en la mujer, casi todos los oocitos del ovario han entrado en la profase meiótica I en el momento del nacimiento. Puesto que no se producen oocitos adicionales durante el periodo de vida de un individuo particular, muchos de estos oocitos permanecen en la misma etapa aproximada de profase durante varios decenios. Debido a que la primera profase meiótica es tan larga y compleja, se acostumbra dividirla en varias etapas (fig. 14-37).

La primera etapa de la profase I es la *leptotena*, durante la cual los cromosomas gradualmente se hacen visibles con el microscopio de luz. Aun cuando se sabe que los cromosomas se duplican en etapa muy temprana, el microscopio de luz no indica si cada cromosoma realmente se compone de un par de cromátides idénticos. Sin embargo, con el microscopio electrónico se observa que los cromosomas se componen de pares de cromátides. Un denso filamento proteináceo, o *cordón axial*, se sitúa en el surco entre las cromátides hermanas de cada cromosoma.

La compactación de los cromosomas continúa a través del leptoteno hasta alcanzar un punto donde los homólogos están listos para asociarse. El proceso para juntar homólo-

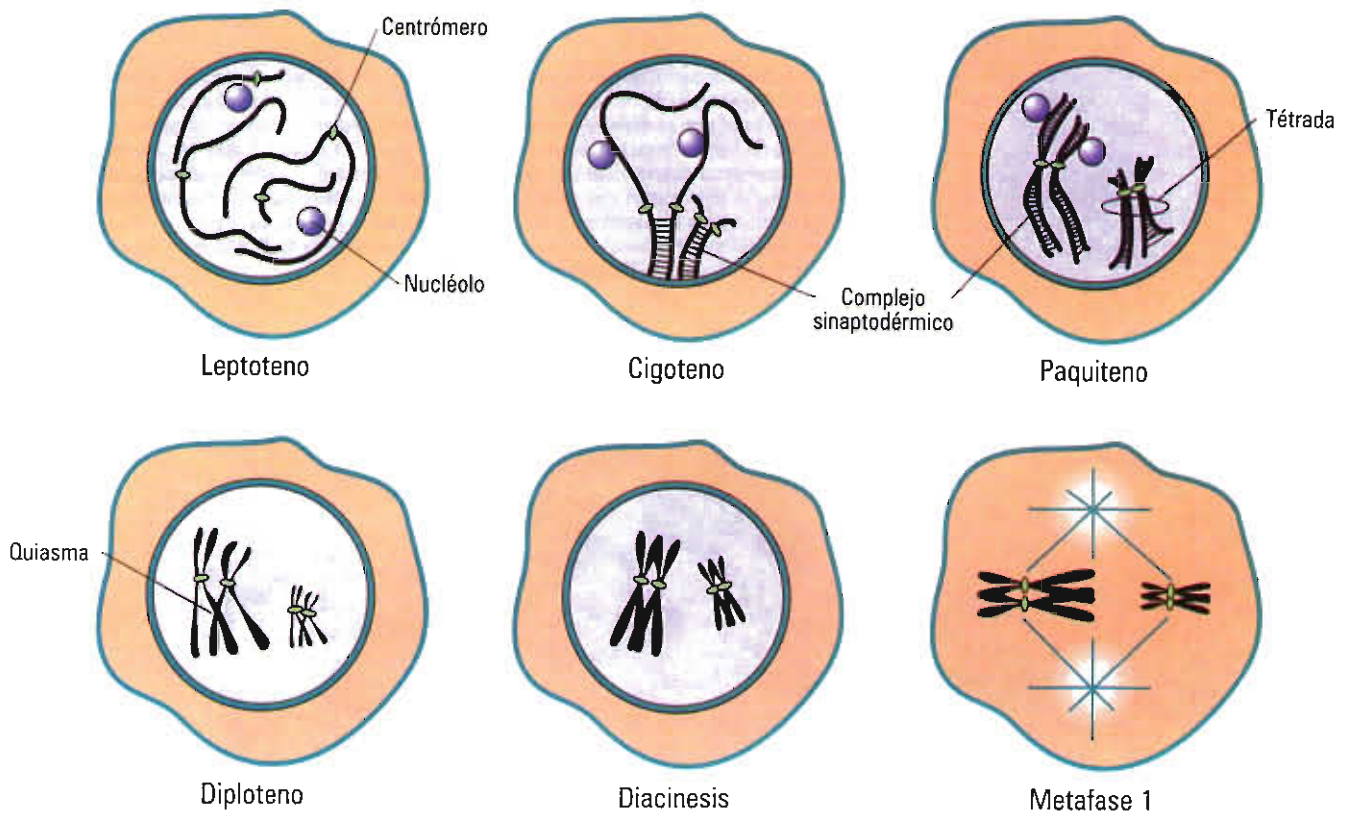
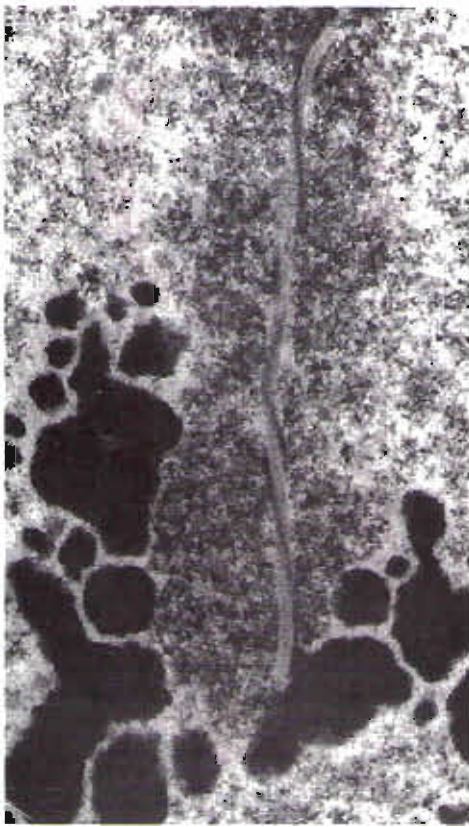


FIGURA 14-37. Etapas de la profase I. Lo que ocurre en cada etapa se describe en el texto.

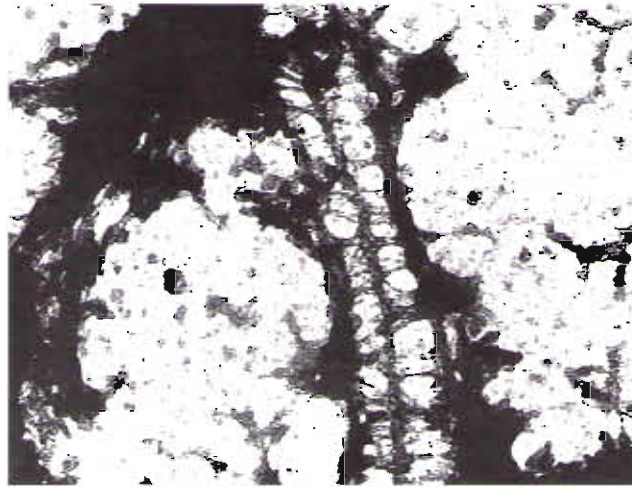
gos entre sí se denomina **sinapsis** y ocurre durante el **cigoteno**, segunda etapa de la profase I. La sinapsis es un acontecimiento intrigante señalado por preguntas importantes aún no respondidas. ¿En base a qué se reconocen los homólogos? ¿Cómo se puede alinear perfectamente el par formado? ¿En qué momento ocurre el primer reconocimiento entre homólogos? Las respuestas a estas preguntas han sido motivo de acalorado debate durante años, y estudios recientes en levaduras añadieron nuevos argumentos a la discusión. En general, se asume que la interacción entre cromosomas homólogos comienza cuando los cromosomas inician la **sinapsis**. Sin embargo, estudios en células de levaduras efectuados por Nancy Kleckner y sus colegas, en la Universidad de Harvard, indican que los segmentos homólogos del DNA procedente de cromosomas homólogos realmente hacen contacto entre sí durante el leptoteno y que la condensación del cromosoma y la sinapsis durante el cigoteno simplemente hacen visible esta disposición bajo el microscopio. Según se analiza en la página 615, el primer paso en la recombinación genética es la ocurrencia de roturas en las dobles cadenas de las moléculas de DNA alineadas en preparación para el entrecruzamiento. Los estudios en levaduras indican que estas roturas ocurren antes del inicio de la sinapsis, lo que sugiere que la recombinación genética empieza antes que los cromosomas sean pares visibles. Como se hace notar más adelante, la recombinación continúa durante las etapas subsiguientes de la meiosis.

El examen con el microscopio electrónico revela que la formación de pares de cromosomas homólogos típicamente ocurre en dos etapas. En la primera etapa, los cromosomas se alinean regularmente pero permanecen separados casi 300 nm. En la segunda etapa, los cromosomas homólogos se aproximan entre sí más estrechamente y alcanzan una relación precisa punto a punto a lo largo de su longitud, pero todavía permanecen separados por una distancia aproximada de 100 nm. Las micrografías electrónicas indican que la sinapsis de los cromosomas ocurre por la formación de una estructura compleja denominada **complejo sinaptonémico**. El complejo sinaptonémico (CS) es una estructura parecida a una escalera (figs. 14-38 y 14-39) compuesta de tres barras paralelas con muchas fibras transversales que conectan la barra central con las dos barras laterales. La cromatina de cada homólogo está íntimamente relacionada con una de las barras laterales del CS que sostiene unidos a los pares de cromosomas. Observaciones sobre el ensamblado del CS indican que sus elementos laterales se derivan directo de los cordones axiales de los cromosomas leptotenos. El CS se puede imaginar como la estructura que sostiene cada par de cromosomas homólogos en la posición apropiada para iniciar la recombinación genética entre cadenas de DNA a medida que se prolonga hacia el centro de la estructura en forma de escalera formada por ambos homólogos. Si la recombinación genética se inicia durante el leptoteno, mucho antes de la formación del CS, entonces



(a)

FIGURA 14-38. Complejo sinaptonémico. *a)* Micrografía electrónica de un corte a través del espermatocito bivalente de un saltamontes. Los cromosomas homólogos se mantienen juntos por el complejo sinaptonémico, del cual se observan los elementos laterales teñidos de oscuro y su elemento central más opaco. El material más oscuro en la periferia del cromosoma es parte del nucléolo que se encuentra fijo a este cromosoma particular. *b)* Micrografía electrónica del complejo sinaptonémico después de tratamiento con DNasa para eliminar las fibras cromosómicas. La estructura restante es la propia estructura semejante a escalera de naturaleza proteínica. (*a:* Cortesía de Peter B. Moens; *b:* según D. Comings y T. Okada, Exp. Cell Res. 65:104, 1971.)



(b)

el CS puede funcionar principalmente como un almacén para permitir que las moléculas de DNA interactuantes continúen sus actividades de entrecruzamiento.

El complejo formado por un par de cromosomas homólogos unidos por sinapsis se denomina **bivalente** o **tétrada**, dos términos sinónimos. El primer término refleja el hecho de que el complejo contiene dos homólogos, en tanto que el último término llama la atención a la presencia de cuatro cromátides. El fin de la sinapsis marca la terminación del cigoteno y el inicio de la siguiente etapa de la profase I, llamada **paquiteno** (fig. 14-37). El paquiteno es la primera etapa de la profase que tiende a ser excesivamente prolongada. En tanto leptoteno y cigoteno por lo general duran unas pocas horas, el paquiteno con frecuencia se extiende por un periodo de días o semanas. Durante este lapso, los homólogos se mantienen unidos por un complejo sinaptonémico (fig. 14-39). Bajo el microscopio electrónico se observan algunos corpúsculos electrónicamente densos de casi 100 nm de diámetro a intervalos regulares en el centro del complejo sinaptonémico. Estas estructuras reciben el nombre de **nódulos de recombinación** porque se cree que contienen el mecanismo que facilita la recombinación genética.

El inicio de **diploteno**, la siguiente etapa de la profase meiótica I, en general se reconoce por la disolución del CS y la tendencia a separarse de los cromosomas homólogos de los bivalentes. Los cromosomas homólogos se separan, pero se puede observar que permanecen fijos en puntos especifi-

cos denominados **quiasmas** (fig. 14-40). Los quiasmas por lo general se localizan en los sitios del cromosoma donde ocurre el intercambio genético durante el entrecruzamiento previo. Aunque no siempre hay correlación 1:1 entre entrecruzamiento y quiasmas, la presencia de estos puntos de fijación suministra una guía visual notable del grado de recombinación.

Durante el desarrollo de la mayor parte de los oocitos, el diploteno es una fase sumamente prolongada de oogénesis en la cual ocurre el crecimiento en masa de la célula. Por lo tanto, la etapa de diploteno que ocurre a mitad de la profase meiótica es un periodo de intensa actividad metabólica. Se puede observar esta actividad en la conducta de los cromosomas. En tanto que los cromosomas paquiteno son compactos, los cromosomas diploteno de células masculinas (espermatoцитos primarios) y femeninas (oocitos primarios) típicamente son difusos y difíciles de observar con el microscopio.

En muchos espermatoцитos y oocitos, los cromosomas diploteno se dispersan en una configuración particular que no se observa en ningún otro momento del ciclo de vida del organismo. Los cromosomas con esta configuración se denominan **cromosomas lampbrush** (fig. 12-14, *b*) y se caracterizan porque tienen un esqueleto axial desde el cual se extienden pares de asas hacia afuera en direcciones opuestas. Las asas se originan en pares porque cada cromosoma consta de pares de cromátides duplicadas y cada

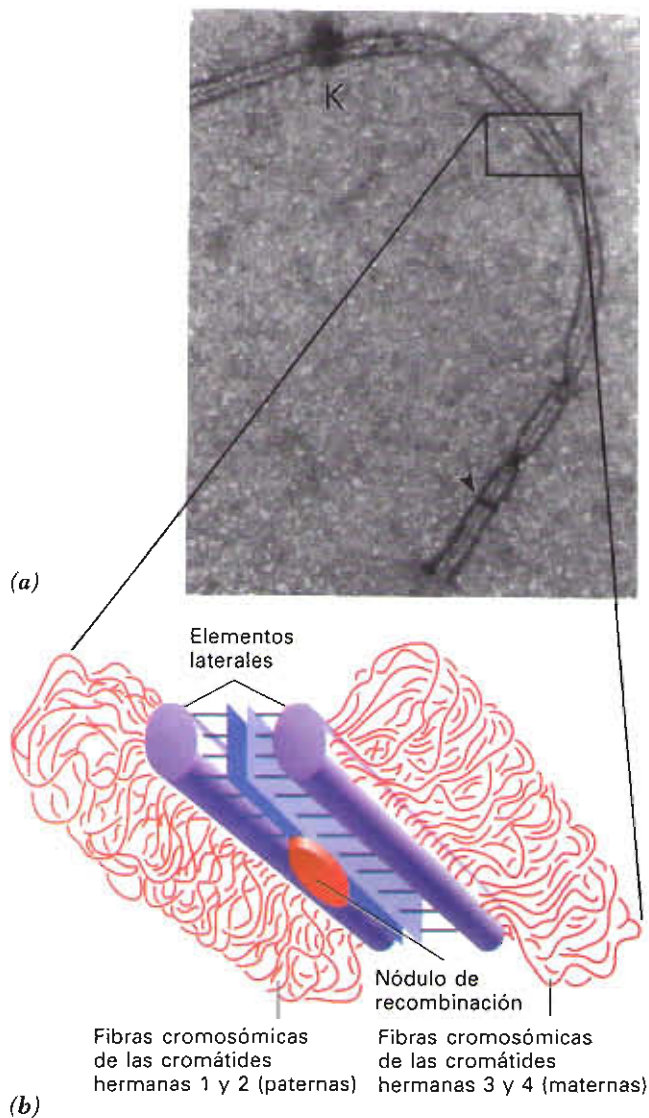


FIGURA 14-39. Entrecruzamiento y el complejo sinaptonémico. *a)* Micrografía electrónica de un cromosoma paquíteno humano que muestra el par de cromátides reunidos en disposición paralela firmemente ordenada (K, cinetocoro). La punta gruesa de la flecha apunta a una barra densa que se observa dentro del complejo sinaptonémico. *b)* Diagrama del complejo sinaptonémico y las fibras cromosómicas acompañantes. Los gránulos densos (nódulos de recombinación) observados en el centro del CS pueden contener el mecanismo enzimático requerido para la recombinación genética, que se cree ocurre en etapa mucho más temprana de la profase I. (Micrografía de Alberto J. Solari, *Chromosoma* 81:330, 1980.)

asa es una prolongación de una sola cromátide. Los dos cromosomas homólogos todavía permanecen unidos entre sí a nivel de los quiasmas. El esqueleto de un cromosoma lampbrush contiene DNA y proteína firmemente asociada, y es transcripcionalmente inactivo. Por lo contrario, el DNA de las asas está muy extendido y es sitio de intensa actividad de transcripción. Los cromosomas lampbrush del oocito proporcionan el RNA utilizado para la producción

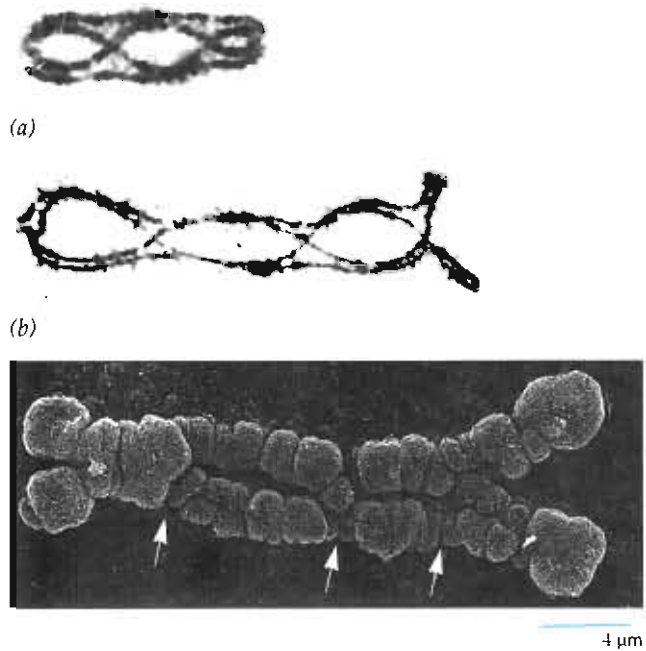


FIGURA 14-40. Demostración visible de entrecruzamiento. *a-b)* Par de bivalentes diploteno procedente de un saltamonte que muestra los quiasmas formados entre cromátides de cada cromosoma homólogo. *c)* Gammagrafía electrónica de un bivalente de sitios desiertos con tres quiasmas (flechas). (*a-b*: Según Bernard John, *Meiosis*, 1990; reimpreso con permiso de Cambridge University Press; *c*: según Klaus Werner Wolf, *Bioess.* 16:108, 1994.)

de proteínas, tanto durante la ovogénesis como durante el desarrollo embrionario temprano después de la fertilización.

En la etapa final de la profase meiótica I, llamada *diacinesis*, los cromosomas se preparan para fijarse a las fibras del huso meiótico. En aquellas especies donde los cromosomas se dispersan extensamente durante el diploteno, durante la diacinesis se vuelven a condensar. La diacinesis termina con la desaparición de los nucléolos, la rotura de la envoltura nuclear y el desplazamiento de las tétradas hacia la placa de la metafase. En oocitos de vertebrados esto se desencadena por un incremento del grado de actividad de la proteincinasa del factor promotor de maduración. En realidad, el FPM se identificó primero por su capacidad para iniciar estos acontecimientos, que representan la *maduración* del oocito (véase *La vía experimental*).

En la mayor parte de las células eucariotas se puede observar que los cromosomas homólogos alineados en la placa de metafase de la meiosis I aún contienen quiasmas, y en realidad estos sitios parecen ser el medio primario mediante el cual los homólogos permanecen juntos como bivalente. De hecho, cada par de homólogos forma cuando menos un quiasma, en tanto que los cromosomas más largos tienden a presentar varios. En los casos donde no se encuentra un quiasma entre cromosomas homólogos por lo general hay una falla del bivalente para mantenerse unido después de la disolución del complejo sinaptonémico. La

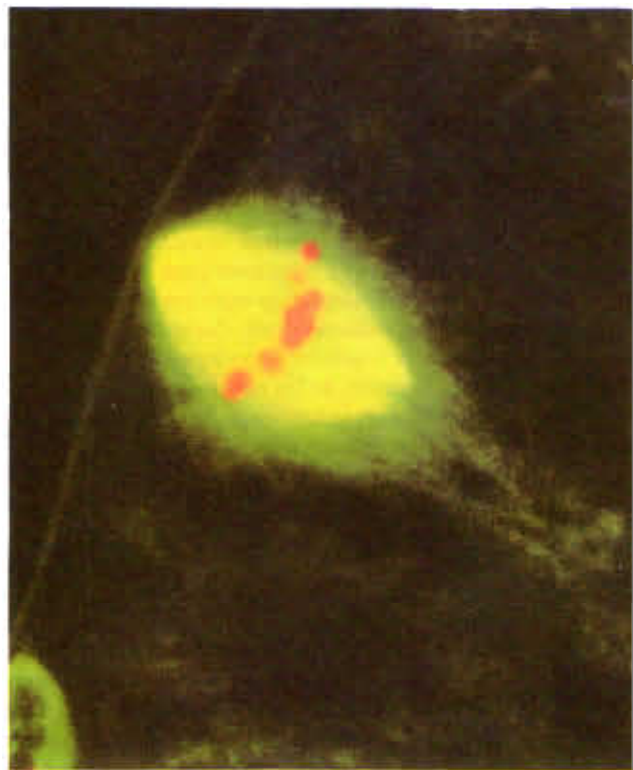
ausencia de quiasma aumenta la probabilidad de que los cromosomas homólogos no se separen durante la primera división meiótica, lo que provoca segregación anormal de cromosomas. La consecuencia de un acontecimiento de esta naturaleza se analiza en *La perspectiva humana* en este capítulo.

En la metafase I se encuentra un par de cromosomas homólogos orientados de tal manera que ambas cromátides de un cromosoma se enfrentan al mismo polo. Por consiguiente, los centrómeros unidos de las cromátides hermanas se sitúan lado a lado en relación al eje largo del huso, y las fibras cromosómicas de un polo dado están conectadas a ambas cromátides de un solo cromosoma (fig. 14-37). Durante la anafase I, los cromosomas homólogos se separan. Puesto que no hay interacción entre una tétrada y otra, los cromosomas materno y paterno de cada tétrada se segregan en dos células hijas independientemente de los otros cromosomas (fig. 14-34). La anafase I es el suceso citológico que corresponde a la ley de Mendel de la permutación independiente (pág. 392). Durante el movimiento hacia la anafase, se puede observar que cada cromosoma está compuesto de dos cromátides todavía asociadas y conectadas entre sí por sus centrómeros.

La telofase I de la meiosis produce cambios menos espectaculares en comparación con la telofase de la mitosis,

puesto que en general los cromosomas no se revierten a un estado de verdadera interfase. Aunque en muchos casos los cromosomas muestran cierto grado de dispersión, no alcanzan el estado de extensión extrema del núcleo en interfase. De manera similar, la envoltura nuclear puede o no reconstituirse durante la telofase I. La etapa entre las dos divisiones meióticas se denomina *intercinesis* y por lo general es de corta duración. En animales, las células en etapa fugaz se conocen como *espermatoцитos secundarios* u *oocitos secundarios*. Se caracterizan porque tiene un número haploide de cromosomas pero una cantidad diploide de DNA nuclear, puesto que cada cromosoma aún está representado por un par de cromátides unidas.

La intercinesis va seguida por la profase II, una profase mucho más simple que su predecesora. Los cromosomas simplemente se vuelven a condensar y se alinean en la placa de la metafase. En contraste con su orientación durante la metafase I, los cinetocoros de las cromátides hermanas de la metafase II se enfrentan a polos opuestos y por último se fijan a conjuntos opuestos de fibras cromosómicas del huso. La metafase II es la etapa durante la cual los oocitos de vertebrados detienen su avance a través de la meiosis y esperan la fertilización (fig. 14-41). Sólo si el huevo no fertilizado entra en contacto con un espermatozoide será estimulado para concluir la segunda división meiótica. La



(a)

10 μm 

(b)

5 μm

FIGURA 14-41. Huevo no fertilizado de un anfibio detenido en metafase II. Igual que en otros vertebrados, la meiosis prosigue después de la segunda metafase meiótica donde espera por la fertilización antes de concluir la meiosis. *a)* Vista lateral mostrando los cromosomas del huso meiótico. *b)* Vista polar de la misma etapa mostrando la distribución de los cromosomas alrededor de la periferia de la célula. (Según David L. Gard, *Develop. Biol.* 151:523, 1992.)

LA PERSPECTIVA HUMANA

No disyunción meiótica y sus consecuencias

La meiosis es un proceso complicado, y en el ser humano al parecer los errores durante la misma son sorprendentemente comunes. Cromosomas homólogos a veces no se separan durante la meiosis I, o cromátides hermanas a veces no se separan durante la meiosis II. Cuando ocurre cualquiera de estas dos situaciones se forman gametos que contienen un número anormal de cromosomas, sea un cromosoma extra o un cromosoma menos (fig. PH 14-1). Si algunos de estos gametos se fusionan con un gameto normal y forma un ci-

gote con un número anormal de cromosomas, sobrevienen consecuencias graves. En la mayor parte de los casos, el cigoto da lugar al desarrollo de un embrión anormal que muere en alguna etapa entre la concepción y el nacimiento. Sin embargo, en unos pocos casos, el cigoto se desarrolla y da lugar a un lactante cuyas células poseen un número anormal de cromosomas, estado que se conoce como *aneuploidia*. El efecto de la aneuploidia depende de que el cromosoma o los cromosomas estén afectados.

En el ser humano, el número normal de cromosomas es de 46, o sea, 22 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales. Un cromosoma extra (que produce un número total de 47 cromosomas) genera un estado que se conoce como *trisomía* (fig. PH 14-2). Una persona cuyas células contienen un cromosoma 21 extra, por ejemplo, padecen trisomía 21. La pérdida de un cromosoma (que produce un total de 45 cromosomas) genera una *monosomía*. Iniciaremos considerando los efectos del número anormal de autosomas.

La ausencia de un cromosoma autosómico, cualquiera que sea el cromosoma afectado, invariablemente es mortal en alguna etapa durante el desarrollo embrionario o fetal. Por consiguiente, un cigoto que contenga una monosomía autosómica no dará lugar a un feto a término. Aunque no sería de esperar que poseer un cromosoma extra genere una enfermedad que ponga en riesgo la vida, el hecho es que las trisomías no se desempeñan mucho mejor que los cigotos monosómicos. De los 22 autosomas diferentes de la dotación completa de cromosomas humanos, sólo las personas con trisomía 21 pueden sobrevivir más allá de las primeras pocas semanas o meses de vida. La mayor parte de las otras trisomías posibles son mortales durante el desarrollo, en tanto que las trisomías para los cromosomas 13 y 18 con frecuencia permiten la vida, pero muestran anomalías tan graves que pronto causan la muerte después del nacimiento. Se estima que casi 25% de los fetos de abortos espontáneos son portadores de una trisomía cromosómica. Se piensa que muchos más cigotos portadores de una cifra anormal de cromosomas producen embriones que mueren en etapa temprana del desarrollo antes de diagnosticar el embarazo. Por ejemplo, por cada cigoto trisómico formado durante la fertilización, al parecer hay un número igual de cigotos mono-

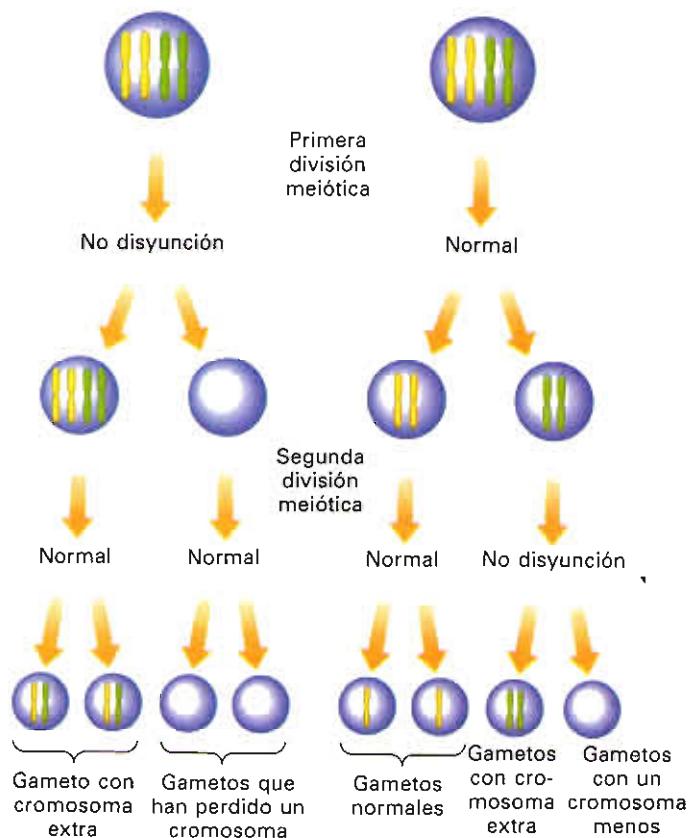


FIGURA PH 14-1. No disyunción meiótica. Ocurre cuando los cromosomas no se separan entre sí durante la meiosis. Si la falta de separación ocurre durante la primera división meiótica, llamada *no disyunción primaria*, todas las células haploides tendrán un número anormal de cromosomas. Si la no disyunción ocurre durante la segunda división meiótica, llamada *no disyunción secundaria*, sólo dos de las cuatro células haploides serán afectadas.

Síndrome de Down

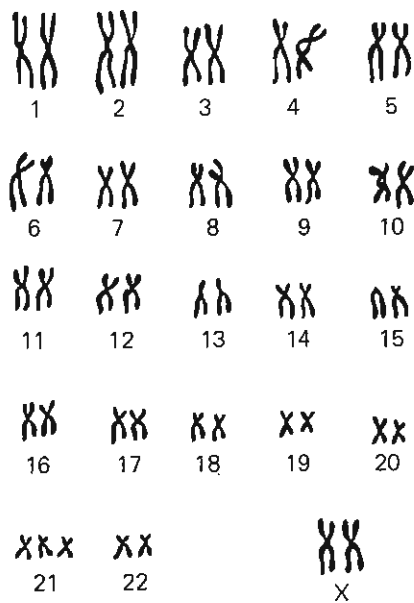


FIGURA PH 14-2. Cariotipo de una persona con síndrome de Down. El cariotipo muestra un cromosoma 21 extra (trisomía 21).

sómicos mucho menos afortunados. Los resultados de un estudio sugieren que hasta 33% de las mujeres embara-

zadas abortan espontáneamente en una etapa donde todavía el embarazo no es reconocible. Si estas cifras son correctas, y nadie argumenta que no lo sea, entonces la no disyunción meiótica en el ser humano ocurre a una tasa notablemente elevada.

Aunque el cromosoma 21 es el más pequeño de los cromosomas humanos, contiene casi 1 500 genes, la presencia de una copia extra de este material genético tiene consecuencias graves que provocan un trastorno llamado síndrome de Down. Las personas con síndrome de Down muestran daño mental, alteración de algunas características del cuerpo, problemas circulatorios frecuentes, mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas, riesgo mucho mayor de desarrollar leucemia y el inicio de la enfermedad Alzheimer en edad temprana. Se cree que todos estos problemas médicos son resultado de la actividad anormal de genes localizados en el cromosoma 21.

La presencia de un número anormal de cromosomas sexuales es mucho menos nociva para el desarrollo humano. Un cigoto con un solo cromosoma X y sin segundo cromosoma sexual (denominado XO) da lugar a una mujer con *síndrome de Turner*, con detención del desarrollo genital en eta-

pa juvenil, los ovarios no se desarrollan y la estructura del cuerpo es ligeramente anormal. Puesto que un cromosoma Y determina sexo masculino, las personas que posean un cromosoma Y cuando menos se desarrollan con el sexo masculino. Un individuo del sexo masculino con un cromosoma X extra (XXY) desarrolla el *síndrome de Klinefelter*, que se caracteriza por retraso mental, genitales poco desarrollados, y la presencia de características físicas femeninas (como glándulas mamarias grandes). Alternativamente, un cigoto con un Y extra (XYY) da lugar al desarrollo de un individuo de sexo masculino de apariencia normal, excepto que tal vez sea de talla más elevada que el promedio. Hay gran controversia respecto de la idea de que los hombres XYY tienden a mostrar conducta más agresiva, antisocial en comparación con los hombres XY. Pero esta correlación nunca se ha comprobado objetivamente.

La probabilidad de tener un hijo con síndrome de Down se eleva de manera espectacular con la edad de la madre: de 0.05% para madres de 19 años de edad hasta casi 3% para mujeres mayores de 45 años. Casi todos los estudios concuerdan en que no se observa una relación parecida entre la

anafase II se inicia con el desdoblamiento sincronizado de los enlaces que contienen unidas a las cromátides hermanas, lo que permite que se desplacen hacia polos opuestos de la célula. La meiosis II termina con la telofase II en la cual los cromosomas una vez más quedan encerrados por una envoltura nuclear. Los productos de la meiosis son células haploides, tanto en el contenido del DNA nuclear como en el número de cromosomas.

Recombinación genética durante la meiosis

Además de reducir el número de cromosomas, un requisito para la reproducción sexual, la meiosis desempeña un papel importante al incrementar la variabilidad genética de una generación a la siguiente dentro de una población de organismos. La permutación independiente permite entremezclar los cromosomas paternos y maternos durante la formación de los gametos, y la recombinación genética también permite lo mismo a los alelos maternos y paternos de un cromosoma determinado (fig. 14-34). Sin la recombi-

ción genética, los alelos presentes a lo largo de un cromosoma particular permanecerían atados generación tras generación. La mezcla de alelos maternos y paternos dentro de cromosomas homólogos por medio de la meiosis genera organismos con nuevos fenotipos y genotipos sobre los cuales puede actuar la selección natural. En la figura 10-6 se ilustra un ejemplo de recombinación entre alelos sobre uno de los cromosomas de la mosca de la fruta. En el capítulo 10 también se hizo notar que la frecuencia de recombinación entre dos alelos sobre un cromosoma es proporcional a la distancia entre ellos, característica que permitió a los genetistas mapear las posiciones relativas de genes a lo largo del cromosoma en organismos que van desde bacterias hasta seres humanos.

Los primeros conocimientos en el proceso de recombinación se obtuvieron gracias a los genetistas clásicos durante el primer decenio de este siglo. En la primera descripción, efectuada por T.H. Morgan y otros, la tensión generada por la torsión de los cromosomas alrededor de sí mismos durante la profase meiótica provocó la fractura de los mismos, de modo que pedazos de cromátides pudieran intercam-

edad del padre y la probabilidad de engendrar un hijo con trisomía 21. Las estimaciones más recientes, según comparaciones de secuencias de DNA entre descendientes y progenitores, indican que casi 95% de las trisomías para cromosoma 21 se pueden seguir hasta falta de disyunción ocurrida en la madre.

Hay varias posibles razones para que una madre de edad avanzada tenga mayor probabilidad de dar a luz un niño con síndrome de Down. Los fetos con anomalías cromosómicas de ordinario se pierden por aborto espontáneo. Es posible que las mujeres de mayor edad presenten menor probabilidad de abortar un feto con trisomía 21, en comparación con mujeres más jóvenes. Esta posibilidad se contradice por el estudio de fetos abortados procedentes de madres de diferentes edades, que sugiere que las mujeres más jóvenes tienen la misma probabilidad de gestar un feto con trisomía 21 a término que una mujer de edad más avanzada. Otra posibilidad es que las mujeres de mayor edad practiquen el coito con menor frecuencia que las mujeres más jóvenes y, por lo tanto, en promedio, sus óvulos probablemente permanezcan en el oviducto durante periodos más prolongados luego de la ovulación

antes de ser fertilizados. Las pruebas no apoyan ninguna de estas posibilidades. Más bien, sugieren que la explicación más directa es la correcta: las mujeres de mayor edad son más susceptibles a la no disyunción meiótica en comparación con mujeres más jóvenes. La mayoría de los genetistas creen que el mayor riesgo es resultado principalmente del envejecimiento de la célula germinal, puesto que permanece por periodos más prolongados en el ovario. En este capítulo se mencionó que todos los oocitos del ovario humano entran en meiosis casi al momento de nacer. Los óvulos fertilizados posteriormente durante la vida reproductiva de la mujer han estado suspendidos en la profase I durante varios decenios. Para entender por qué un retraso en la conclusión de la oogénesis debe incrementar la probabilidad de no disyunción, es necesario saber más acerca de la etapa de la meiosis que al parecer está afectada.

Ya antes se hizo notar que una cifra anormal de cromosomas puede ser resultado de la no disyunción en cualquiera de las dos divisiones meióticas (fig. PH 14-1). Aunque estos diferentes acontecimientos de no disyunción producen el mismo efecto en número de cromosomas en el cigoto, se pueden

distinguir mediante análisis genético, puesto que la no disyunción primaria transmite dos cromosomas homólogos al cigoto, en tanto que la no disyunción secundaria transmite dos cromátides hermanas (con mayor probabilidad de ser alteradas por entrecruzamiento) al cigoto. Los estudios indican que la mayor parte de los errores ocurren durante la meiosis I. Por ejemplo, en un estudio de 433 casos de trisomía 21 provocados por no disyunción materna, 373 fueron resultado de errores ocurridos durante la meiosis I y 60 resultado de errores durante la meiosis II.

¿Por qué la meiosis I es más susceptible a no disyunción que la meiosis II? En un estudio con mapeo genético de trisomía para el cromosoma 21 se observó que los cromosomas heredados de la madre muestran mucha menor probabilidad de sufrir recombinación genética. En la página 609 se hizo notar que los quiasmas, o indicadores visuales de recombinación genética, desempeñan un papel importante para mantener junta a la tétrada. Se deduce que la menor posibilidad de recombinación genética, que conduce a reducción de la probabilidad de la formación de quiasmas, provocaría mayor riesgo de no disyunción en la meiosis I.

biarse entre cromosomas homólogos. En este concepto, se piensa que el entrecruzamiento implica un verdadero *rompimiento y reunión* física del material cromosómico. La demostración de que la recombinación ocurre por rompimiento y reunión en eucariotes se confirmó por primera vez mediante autorradiografía utilizando cromosomas meióticos del saltamontes marcados con timidina radiactiva. En estos experimentos, las células germinales se expusieron al precursor de DNA radiactivo durante la fase S de la división mitótica previa, de modo que para el momento que se alcanzó la primera profase meiótica sólo una cromátide de cada cromosoma estaría marcada. A continuación se tomaron autorradiografías después de que ocurrió el entrecruzamiento, y se observó que ciertas cromátides contienen granos plateados que sólo cubren parcialmente su longitud (fig. 14-42). Esto indica que ocurrió intercambio físico entre cromátides marcadas y no marcadas. Más aún, los segmentos marcados y no marcados de una cromátide mostraron un patrón recíproco al de otra cromátide de la misma tétrada.

Cuando se propuso por primera vez el concepto de rompimiento y reunión se asumió que cada cromosoma

homólogo se separa por completo transversalmente en dos pedazos, y un pedazo de un cromosoma se intercambia con el correspondiente pedazo de su homólogo. Sin embargo, luego que se comprobó que los cromosomas meióticos contienen numerosas fibras de DNA situadas lado a lado, fue evidente que el rompimiento de una cromátide entera compactada afectaría a cientos de genes que no sería posible volver a unir con sus contrapartes de otro cromosoma. Los estudios de recombinación genética entre diferentes genomas virales o bacterianos enfocaron su atención a las moléculas simples de DNA y a los mecanismos que podían romperlas y recombinarlas. Como se analiza a continuación, la recombinación implica el rompimiento físico de las moléculas de DNA y la fusión de los extremos separados de un DNA dúplex con los otros extremos separados del dúplex del cromosoma homólogo. La recombinación es un proceso de notable precisión que ocurre entre sitios correspondientes entre moléculas de DNA homólogas sin adición o pérdida de un solo par de bases. La precisión de la recombinación está garantizada por la participación de enzimas de reparación de DNA capaces de llenar las brechas que se

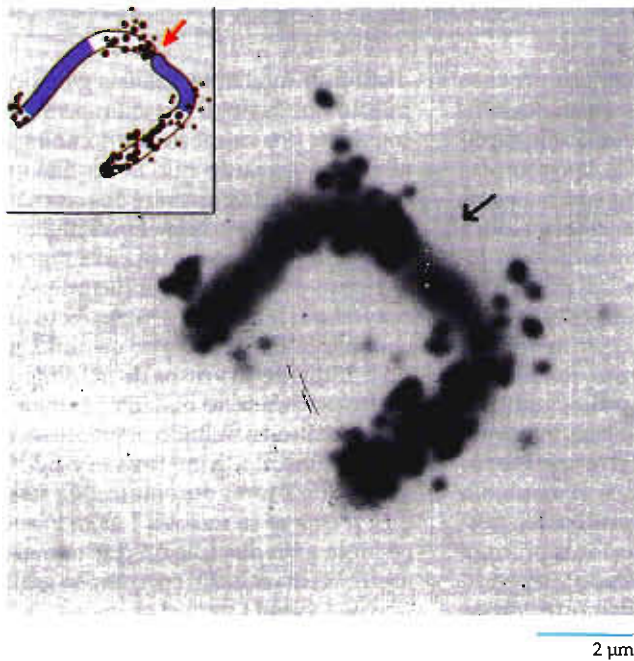


FIGURA 14-42. Demostración experimental de rompimiento y reunión de cromosomas durante el entrecruzamiento. Autorradiografía de un par de cromátides hermanas aisladas de los testículos de un saltamontes en metafase II utilizando colquicina para detener los acontecimientos en esa etapa. La célula a partir de la cual se preparó este cromosoma había incorporado ^3H -timina un ciclo antes de la interfase premeiótica, de modo que en ausencia de entrecruzamiento, una cromátide de cada cromosoma duplicado debía estar completamente marcada y una sin marca. Puesto que las cromátides contienen segmentos marcados y no marcados, indica que ocurre intercambio de material cromosómico entre las cromátides en la profase I precedente. La flecha indica la posición de los centrómeros terminales que localizan dónde se juntan las dos cromátides hermanas. (Según J. Herbert Taylor, J. Cell Biol. 25:63, 1965; con permiso de Rockefeller University Press.)

forman durante el proceso de intercambio. Se conoce relativamente poco acerca del mecanismo específico empleado durante la recombinación genética en células eucariotas, pero estudios sobre genomas virales y fagos proporcionan bases para visualizar un escenario factible.

En el modelo más sencillo, los dos DNA dúplex que están a punto de recombinarse se alinean uno a continuación del otro como resultado de algún tipo de *búsqueda de homología*, durante la cual las moléculas de DNA homólogas se reconocen entre sí en preparación para la recombinación (fig. 14-43, paso 1). Una vez alineadas, se producen roturas en sitios correspondientes de cada cadena del dúplex (fig. 14-43, paso 2). Las cadenas rotas se separan a continuación de su respectiva pareja complementaria y cada una deja su propio dúplex e invade a la otra molécula de DNA, enlazándose al hidrógeno de la cadena complementaria en el dúplex vecino (fig. 14-43, pasos 3 y 4). En *E. coli*, este proceso durante el cual una sola cadena puede invadir un dúplex homólogo y desplazar la cadena correspondiente dentro del dúplex, es catalizada por una proteína multifuncional denominada *proteína recA*. Como resulta-

do de este intercambio recíproco de cadenas de DNA, los dos dúplex se unen entre sí para formar una estructura interconectada denominada *estructura Holliday*, por el nombre del investigador que la propuso, según se muestra en la figura 14-43, paso 5. Este tipo de intermediario no necesariamente es una estructura estática, puesto que el punto de unión debe tener capacidad para desplazarse en una dirección u otra (suceso conocido como *migración de rama*) mediante la rotura de los puentes de hidrógeno que sostienen a los pares originales de cadenas y que reconstituyen a los enlaces de hidrógeno entre las cadenas de los dúplex recién unidos (fig. 14-43, paso 6). Se cree que con el desplazamiento del punto de entrecruzamiento por medio de la migración en rama también se requiere la ayuda de enzimas de recombinación de DNA.

Mediante el examen con microscopio electrónico de moléculas de DNA aisladas de células bacterianas sorprendidas en el acto de recombinación se han obtenido pruebas directas de la existencia de un intermediario para recombinación del tipo mostrado en la figura 14-43, paso 6. La figura 14-44 muestra dos genomas del bacteriófago λ unidos de tal manera que una cadena de cada dúplex se continúa con la cadena del otro dúplex. Este par de moléculas de DNA tiene el tipo de conexión por entrecruzamiento pronosticada por el modelo de Holliday, como se puede observar cuando el intermediario mostrado en la figura 14-43, pasos 5 al 7, se gira según se muestra en la figura 14-43, paso 8, de modo que adopta una configuración (fig. 14-43, paso 9) en la cual se observan cuatro segmentos de doble hélice que surge de un anillo de conexión al DNA de cadena simple. Este mismo tipo de intermediario de recombinación se puede obtener *in vitro* si se mezclan moléculas de DNA en presencia de extractos de células bacterianas. Como se analiza a continuación, el extracto bacteriano contiene proteínas capaces de catalizar las reacciones apropiadas de rompimiento y reunión mediante las cuales las moléculas de DNA separadas se pueden unir a enlaces covalentes. Se presume que en células eucariotas hay proteínas similares.

El intermediario de recombinación mostrado en la figura 14-43, paso 9, se forma por el rompimiento de dos cadenas simples y la fusión subsecuente de ambas entre sí. Para reconstituir un par de dúplex de DNA discreto, debe ocurrir otra vuelta de rompimiento y fusión de DNA. En la figura 14-43 se muestran dos vías alternas de rompimiento y fusión. En un caso (fig. 14-43, paso 10, izquierda), las mismas cadenas previamente desdobladas se rompen una vez más, lo que produce dos dúplex que sólo contienen tramos cortos intercambiados genéticamente (fig. 14-43, paso 12, izquierda). En contraste, si las cadenas no se han separado previamente y en esta segunda etapa de la recombinación se forman muescas sobre las mismas (fig. 14-43, paso 10, derecha), entonces el dúplex de una molécula de DNA se une al dúplex de la molécula homóloga generando una fusión de los cromosomas materno y paterno (fig. 14-43, paso 12, derecha), o sea, un entrecruzamiento. Este último tipo de suceso se descubre en estudios para conocer la frecuencia de recombinación entre alelos maternos y paternos (pág. 393).

La secuencia de eventos mostrados en la figura 14-43 se inicia por el rompimiento que ocurre sobre una sola ca-

FIGURA 14-43. Mecanismo propuesto para la recombinación genética iniciada por el rompimiento de cadenas simples. Los pasos se describen en el texto. (Según H. Potter y D. Dressler, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73:3003, 1976.)

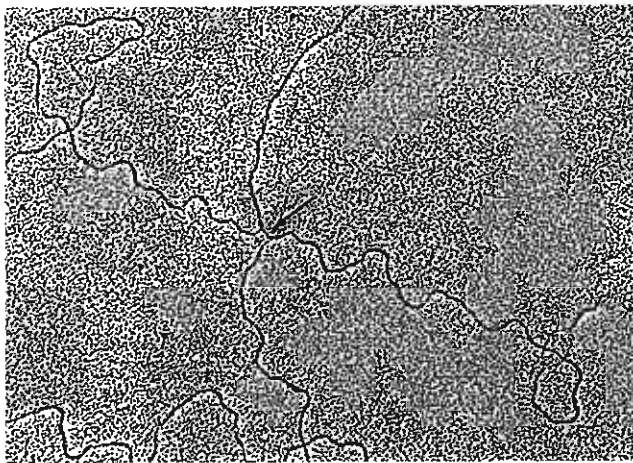
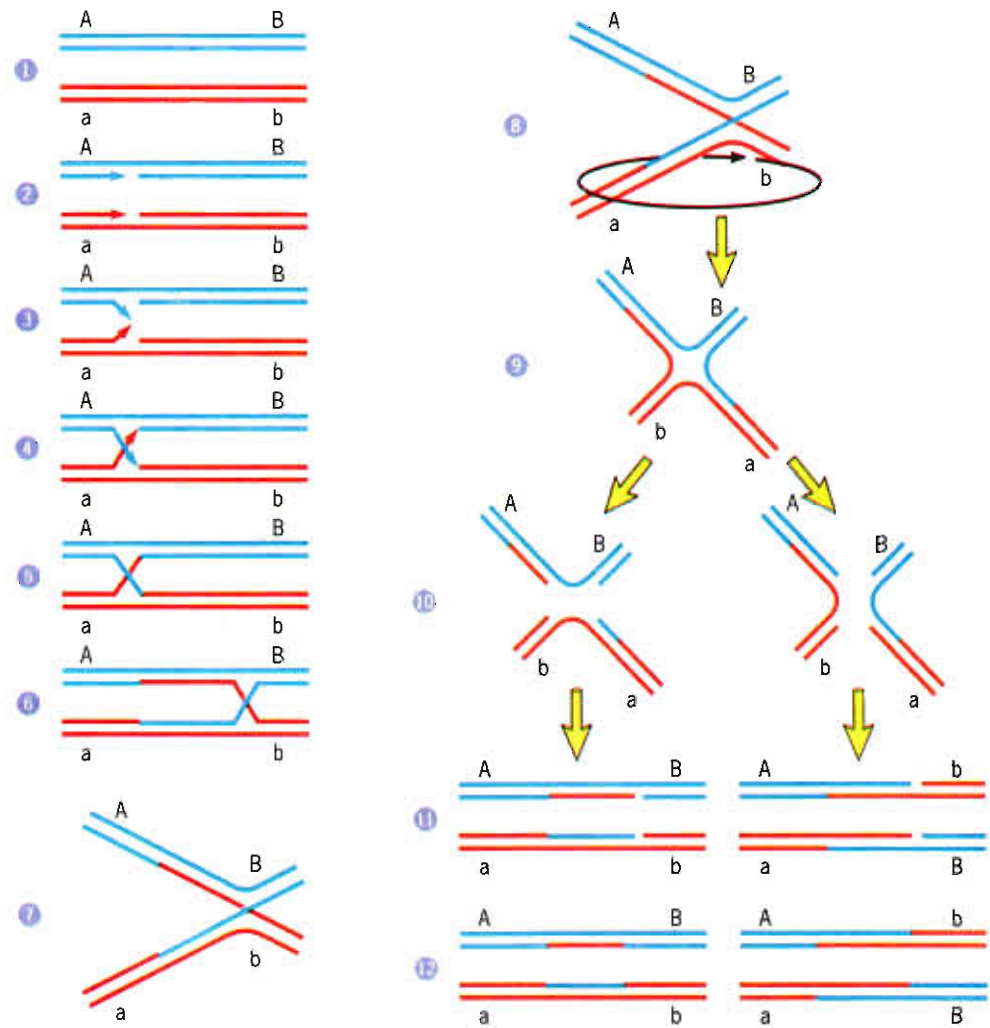


FIGURA 14-44. Visualización del intercambio de cadenas de DNA. Micrografía electrónica de dos moléculas del fago I unidas a un sitio de entrecruzamiento (flecha). Se cree que esta imagen corresponde al diagrama de la figura 14-43, paso 9. (Según Manuel Valenzuela y Ross B. Inman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:3024, 1975.)

dena de cada dúplex. Habiendo revisado los pasos implicados en este proceso, que se cree ocurre extensamente durante la recombinación de células bacterianas, estamos en mejor situación para considerar un modelo alternativo de recombinación (fig. 14-45), que implica una serie más complicada de acontecimientos, pero que tiene mayor probabilidad de ser la causante del entrecruzamiento durante la meiosis en células eucariotas. La diferencia primaria entre el proceso ilustrado en la figura 14-43 y el que se muestra en la figura 14-45 es que este último se inicia por rompimiento de la doble cadena más bien que por rompimiento en cadenas simples, y el proceso mostrado en la figura 14-45 implica la actividad de nucleasas y polimerasas para llenar las brechas en las diferentes cadenas, similar a lo que ocurre durante la reparación del DNA (pág. 568). Los pasos en el mecanismo propuesto se describen en el pie de la figura acompañante. Prácticamente nada se conoce acerca de genes específicos y sus productos capaces de dirigir las complejas actividades de la recombinación del DNA que ocurren durante la meiosis en células eucariotas.

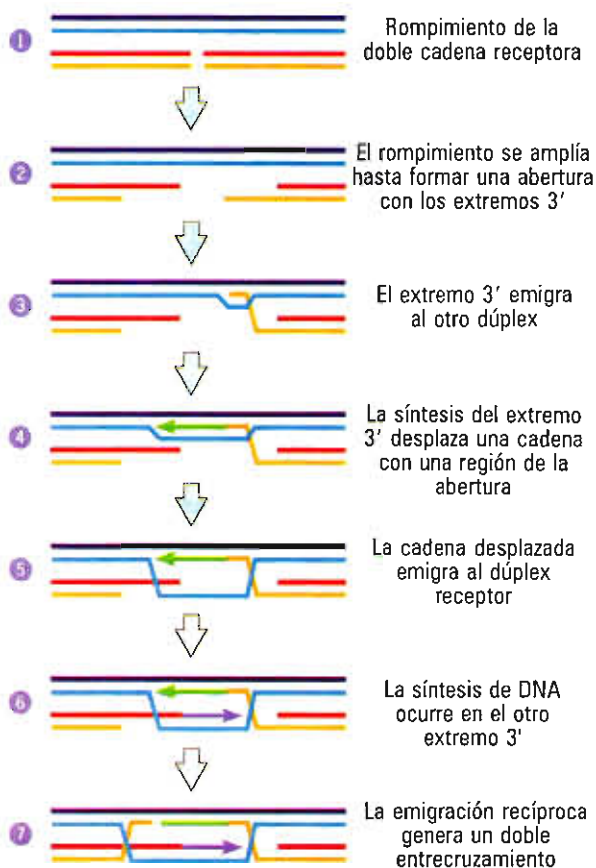


FIGURA 14-15. Mecanismo propuesto para la recombinación genética iniciada con rompimiento de la doble cadena. En este modelo, la recombinación se inicia con el rompimiento de la doble cadena en uno de los dúplex (llamado dúplex receptor) provocado por hidrólisis de los enlaces fosfodiéster en ambas cadenas mediante la acción de una endonucleasa (paso 1). Una vez cortada la cadena, la abertura se amplía por acción de otra nucleasa para producir extremos escalonados en los cuales la cadena superpuesta contiene un extremo 3' libre (paso 2). Uno de los extremos 3' libres del dúplex receptor invade a continuación al dúplex homólogo intacto (donador), desplazando la cadena correspondiente del dúplex donador hacia la región de la abertura (paso 3). Puesto que la cadena desplazada sobresale del dúplex donador, la estructura se conoce como *asa D*, debido a que recuerda a la letra D. En el siguiente paso, una DNA polimerasa añade nucleótidos al extremo 3' de la cadena invasora, desplazando más nucleótidos del dúplex donador, alargando así el asa D (paso 4). Cuando la hendidura en el dúplex donador se llena por síntesis de DNA, la cadena desplazada del dúplex donador emigra hacia la hendidura en el dúplex receptor (paso 5), y la cadena complementaria del dúplex receptor se llena en una segunda vuelta de síntesis de DNA (paso 6). La estructura mostrada en el paso 7 generada por la secuencia de acontecimientos ya descritos contiene dos sitios donde los dúplex permanecen desconectados; ambos sitios deben ser llenados por un proceso de tipo rompimiento y fusión indicado en la figura 14-43, pasos 10 a 12. Si las mismas cadenas se rompen y funden en ambos sitios de interconexión, entonces sólo una corta región de las moléculas de DNA será afectada. Por lo contrario, si se rompen y funden diferentes cadenas en los dos sitios, entonces los cromosomas materno y paterno se habrán fusionado y ocurre entrecruzamiento genético. (Según B. Lewin, *Genes V*, p. 974, Oxford University Press, 1994.)

LA VIA EXPERIMENTAL

Descubrimiento y caracterización del factor promotor de maduración (FPM)

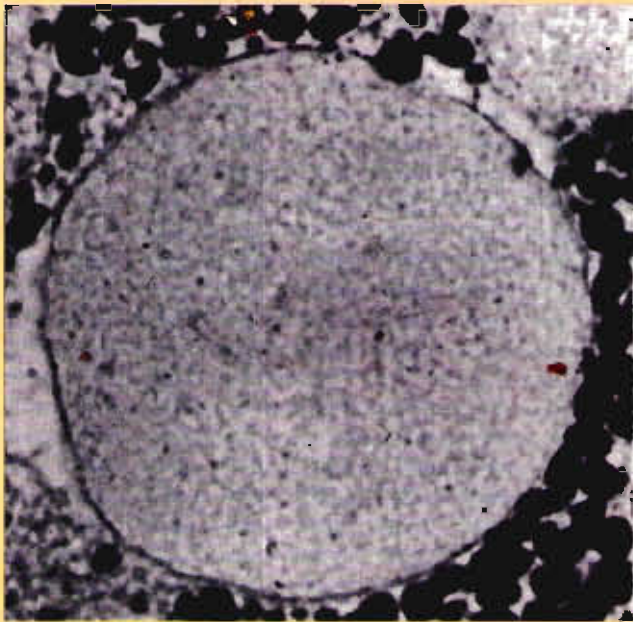
Es frecuente imaginar el núcleo como centro de control de la célula, pero las actividades del núcleo están firmemente controladas por agentes reguladores que se mueven dentro del nucleoplasma del citoplasma. Durante el decenio de 1960, se diseñaron varios sistemas experimentales que permitieron a los biólogos celulares iniciar el estudio de factores citoplásmicos capaces de desempeñar un papel en el gobierno de las actividades nucleares, incluyendo transcripción, duplicación y preparación para la mitosis. Ya hemos analizado el empleo de la fusión de células en estos primeros estudios (pág. 583). En otro método, se eliminaron núcleos de un tipo de célula y se inyectaron a células de diferente tipo para determinar los efectos que el nuevo ambiente citoplásmico podía tener sobre las actividades de núcleos recién trasplantados. Debido a su gran tamaño, actividades sintéticas definidas y vigorosa constitución, los oocitos y óvulos de anfibios se han empleado desde

hace mucho como sistema de prueba para recibir materiales inyectados. En la mayor parte de estos estudios se emplea la rana leopardo *Rana pipiens* o el sapo con garras *Xenopus laevis*; ambos se pueden criar fácilmente en cautiverio y mediante inyección de hormonas producen un gran número de huevos.

A finales del decenio de 1960, John Gurdon y sus colegas, de la Universidad de Oxford, efectuaron experimentos con *Xenopus* en los cuales inyectaron núcleos aislados de diferentes orígenes al citoplasma de oocitos o huevos fertilizados. Aunque el oocito y el huevo de un anfibio son muy similares (el último se deriva del primero), sus actividades de síntesis son muy diferentes. Los oocitos empleados en estos experimentos sintetizan grandes cantidades de RNA ribosómico y mensajero, pero no sintetizan DNA puesto que su duplicación ocurre en una etapa anterior de la ovogénesis. Por lo contrario, un huevo recién fertilizado es un sintetizador activo de DNA,



(a)

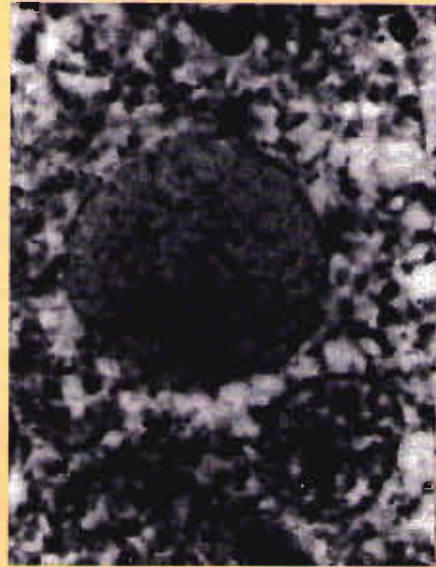


(b)

FIGURA VE 14-1. *a)* Núcleos de tamaño normal aislados de células de un embrión de *Xenopus* en etapa de blástula. *b)* El mismo tipo de núcleos mostrados en *a* luego de trasplantarlos al citoplasma de un oocito. Los núcleos están amplificadas casi 200 veces. (Cortesía de John B. Gurdon.)

pero prácticamente no sintetiza RNA. Las proteínas sintetizadas durante las primeras etapas del desarrollo de los anfibios se traducen a partir del RNAm sintetizado antes de la fertilización y almacenado en forma inactiva en el citoplasma del huevo (sección 12-3).

Gurdon observó que los núcleos trasplantados en una u otra de estas dos células adoptaron las características de síntesis conforme a su nuevo ambiente, cualquiera que sea su actividad en el momento del trasplante.^{1,2} Por ejemplo, si el núcleo de un embrión en etapa de blástula, caracterizado por su baja tasa de síntesis de RNA y elevada tasa de síntesis de DNA, se trasplanta al interior de un oocito, el núcleo detiene la síntesis de DNA e incrementa notablemente la síntesis de RNA.



(a)



(b)

FIGURA VE 14-2. Determinación por medio de autorradiografía de incorporación al DNA de timidina marcada luego de la inyección de núcleos de cerebro de rana en un oocito (*a*) y un óvulo fertilizado (*b*). Los núcleos de cerebro normalmente sintetizan RNA pero no DNA. Cuando estos núcleos se trasplantan al interior del oocito (*a*), no se encuentran datos de síntesis de DNA. En contraste, cuando los núcleos se inyectan en el óvulo activado (*b*), los núcleos cerebrales desencadenan la síntesis de DNA en respuesta a las condiciones del citoplasma en la célula huésped. (Cortesía de John B. Gurdon.)

El núcleo responde así al estado de citoplasma en el cual se encuentra y sufre reprogramación. No sólo se modifica la actividad de síntesis del núcleo, sino también su aspecto morfológico. El núcleo normal del oocito, llamado *vesícula germinal*, es enorme en comparación con el núcleo de una blástula de tama-

ño normal. El trasplante del núcleo de la blástula al interior del oocito provoca hinchazón rápida del trasplante (fig. VE 14-1), que imita la morfología de la propia vesícula germinal del oocito. En un experimento de tipo inverso, se tomaron núcleos de un homogenado de tejido cerebral y se inyectaron a un huevo fertilizado y pronto participaron en la síntesis de DNA (fig. VE 14-2). Puesto que las células nerviosas son incapaces de efectuar división celular, la síntesis de DNA en estos núcleos trasplantados representa la activación de una función inactivada años atrás.

Conforme un oocito de anfibio se aproxima a la final de la ovogénesis, la gran vesícula germinal se desplaza a la periferia de la célula, la envoltura nuclear se desensambla, los cromosomas compactados se alinean en una placa metafásica cerca de un extremo (polo animal) del oocito, y las células sufren la primera división meiótica produciendo un gran oocito secundario y un pequeño corpúsculo polar. Este proceso de desdoblamiento de la vesícula germinal y primera división meiótica se conoce como *maduración* y se puede inducir en oocitos aislados totalmente desarrollados (o sea, oocitos eliminados del folículo ovárico) mediante tratamiento con la hormona esteroide progesterona. El primer signo de maduración en el oocito tratado con la hormona se observa aproximadamente 13 a 18 horas después conforme la vesícula germinal se desplaza hacia la superficie del oocito. Pronto se desdobra la vesícula germinal y el oocito alcanza la metafase de la segunda división meiótica, más o menos a las 36 horas después del tratamiento con la hormona. Se observó que la progesterona es eficaz para inducir la maduración sólo si se aplica al oocito en el medio externo; si la hormona se inyecta dentro del oocito, éste no muestra respuesta.³ Al parecer, la hormona actúa sobre la superficie celular para desencadenar cambios secundarios en el citoplasma del oocito que conducen a la rotura de la vesícula germinal y a los otros cambios relacionados con la maduración.

Para conocer más acerca de la naturaleza de los cambios citoplásmicos que desencadenan la maduración, Yoshio Masui, de la Universidad de Toronto, y Clement Markert, de la Uni-

versidad Yale, iniciaron una serie de experimentos en los cuales retiraron citoplasma de oocitos aislados en diferentes etapas luego del tratamiento con progesterona, e inyectaron 40 a 60 nanolitros (nl) del citoplasma donador en oocitos inmaduros totalmente desarrollados que no fueron tratados con la hormona.⁴ Estos investigadores observaron que el citoplasma tomado de oocitos durante las primeras 12 horas después del tratamiento con progesterona tenían poco o ningún efecto sobre los oocitos receptores. Sin embargo, luego de este periodo, el citoplasma adquirió la capacidad de inducir maduración en el oocito receptor. Masui y Markert observaron que el citoplasma procedente del oocito donador mostraba máxima eficacia casi 20 horas después del tratamiento con progesterona, y que esta eficacia disminuía a las 40 horas, aproximadamente (fig. VE 14-3). Pero el citoplasma tomado de embriones tempranos todavía mostraba cierta capacidad para inducir la maduración del oocito. Masui y Markert denominaron a la sustancia con efecto sobre los oocitos receptores como factor promotor de maduración, después conocido como FPM.

Desde entonces se asumió que FPM participa de manera específica para desencadenar la maduración del oocito, y se prestó relativamente poco interés a la sustancia o a su posible mecanismo de acción. En 1978, William Wasserman y Dennis Smith, de la Universidad Purdue, publicaron un trabajo acerca de la conducta del FPM durante las primeras etapas del desarrollo.⁵ Se asumía que la actividad del FPM presente en el embrión temprano simplemente era un residuo de la actividad presente en el oocito. Pero Wasserman y Smith descubrieron que la presencia de actividad FPM en el embrión en desarrollo mostraba oscilaciones espectaculares correlacionadas con cambios en el ciclo celular. En una serie de experimentos sobre huevos en desarrollo de *Rana* (fig. VE 14-4), se encontró que el citoplasma tomado de estos huevos antes de 30 a 60 minutos después de la fertilización mostraban actividad FPM escasa o no detectable en el ensayo por inyección a oocitos inmaduros. Sin embargo, empleando el mismo volumen de citoplasma inyectado se descubrió actividad una vez más en los huevos donadores 90 minutos después de la fertilización, la cual al-

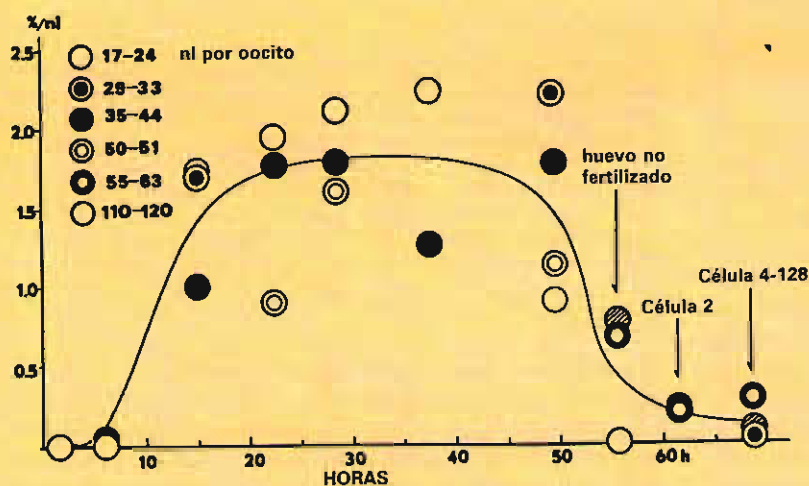


FIGURA VE 14-3. Cambio de actividad del factor promotor de la maduración en el citoplasma del oocito durante el curso de la maduración y el desarrollo temprano. Abscisa: Edad de los donadores (horas después de la administración de progesterona). Ordenada: Proporción entre frecuencia de maduración inducida y volumen de citoplasma inyectado. Cuanto mayor sea la proporción, más eficaz el citoplasma. Se observó que el citoplasma del oocito presenta una eficacia máxima entre 20 y 40 horas después del tratamiento con progesterona. nl, Nanolitros de citoplasma inyectado. (Según Y. Masui y C.L. Markert, J. Exp. Zool. 177:142, 1971.)

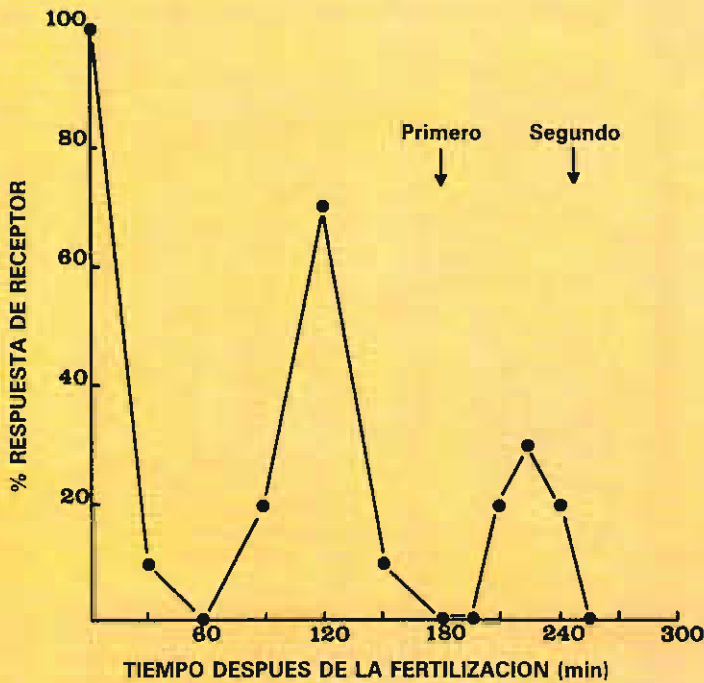


FIGURA VE 14-4. Actividad cíclica de FPM en óvulos fertilizados de *R. pipiens*. Ordenada: Porcentaje de oocitos receptores que sufren desdoblamiento de la vesícula germinal en respuesta a 80 nanolitros de citoplasma procedente de óvulos fertilizados. Abscisa: Tiempo después de la fertilización cuando se probó la actividad del FPM en el citoplasma del huevo de rana. Las flechas indican el momento de las divisiones. (Según W.J. Wasserman y L.D. Smith, J. Cell Biol. 78:R17, 1978; con permiso de Rockefeller University Press.)

canzó un máximo a los 120 minutos y comenzó a declinar una vez más a los 150 minutos. Cuando los huevos sufrieron su primera citocinesis a los 180 minutos, no se pudo determinar actividad alguna en los huevos. A continuación, conforme ocurrió el segundo ciclo de desdoblamiento una vez más reapareció la FPM alcanzando un máximo a los 225 minutos después de la fertilización y luego declinó una vez más a niveles sumamente bajos. Se observaron resultados similares utilizando huevos *Xenopus*, excepto que las oscilaciones de la actividad FPM ocurrieron con mayor rapidez que en *Rana*, lo que se correlaciona con la tasa más rápida de divisiones en el embrión temprano *Xenopus*. Por lo tanto, la actividad FPM desaparece y reaparece en ambas especies de anfibios en una escala de tiempo que se correlaciona con la duración del ciclo celular. En ambas especies, la actividad FPM máxima se correlaciona con el momento de rotura de la membrana nuclear y la entrada de las células en mitosis. Estos datos sugieren que FPM tiene un papel mucho más amplio que simplemente controlar el momento de la maduración del oocito y, en realidad, puede desempeñar un papel clave en la regulación del ciclo celular de células en división.

En esa misma época se puso de manifiesto que el FPM posee una actividad que no es peculiar a huevos y oocitos de anfibios, pero que aparece en una gran variedad de organ-

ismos, y que además la naturaleza de la sustancia es altamente conservada. Por ejemplo, se observó que las células de mamíferos que crecen en cultivo también poseen actividad FPM demostrable por la capacidad de sus extractos para inducir el rompimiento de vesículas germinales luego de inyectarlos en oocitos de anfibios.⁶ La actividad FPM de estas células varía con el ciclo celular, como ocurre en huevos de anfibio. Los extractos de células cultivadas HeLa preparados a partir de células en fase G₁ inicial, G₁ tardía o S carecen de actividad FPM (fig. VE 14-5). El FPM apareció en el G₂ temprano, se elevó espectacularmente en el G₂ tardío, y alcanzó un máximo durante la mitosis.

Otro elemento del mecanismo que regula el ciclo celular se descubrió en estudios sobre embriones del erizo de mar. Los huevos del erizo de mar son materia favorita para estudios de división celular porque las divisiones mitóticas que siguen a la fertilización ocurren con rapidez y están separadas por intervalos muy predecibles. Si los huevos de erizo de mar se fertilizan en agua de mar que contenga un inhibidor de la síntesis de proteínas, los huevos no sufren la primera división mitótica, se detienen en etapa previa a la condensación de cromosomas y del rompimiento de la envoltura nuclear. De manera similar se pueden bloquear las subsecuentes divisiones mitóticas si se añade un inhibidor de la síntesis de proteínas al medio mucho antes que ocurra la división normal. Este dato su-

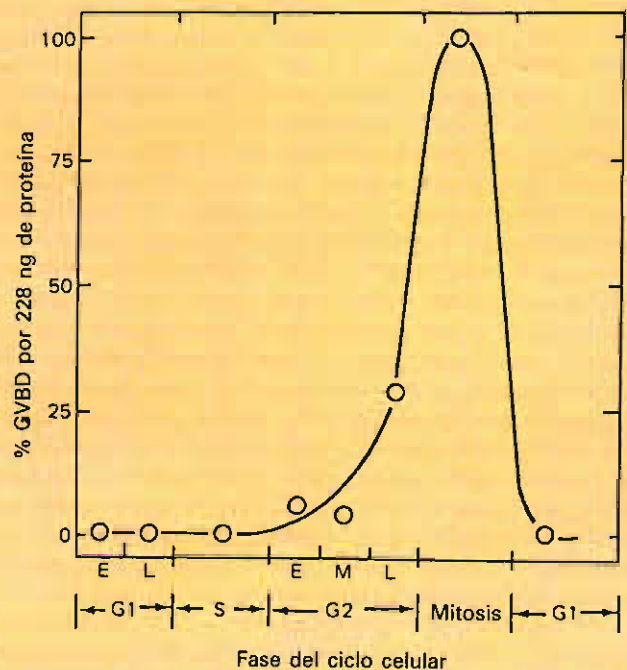


FIGURA VE 14-5. Actividad promotora de la maduración de extracto de células HeLa durante diferentes etapas del ciclo celular. Puesto que 228 ng de proteína mitótica inducen el desdoblamiento de la vesícula germinal en 100% de los casos, se normalizó el porcentaje de actividad de otras fases del ciclo celular contra esta cantidad de proteína. (Según P.S. Sunkara, D.N. Wright y P.N. Rao, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76:2801, 1979.)

giere que se deben sintetizar una o más proteínas durante cada uno de los primeros ciclos celulares para que ocurra la inminente división mitótica. Pero los primeros estudios acerca de la división de los huevos de erizo de mar no revelaron la aparición de nuevas proteínas durante ese periodo.

En 1983, un estudio efectuado por Tim Hunt y sus colegas, en el Marine Biological Laboratory at Woods Hole, demostraron que se sintetizan varias proteínas en el huevo de erizo de mar fertilizado que no se producen antes de la fertilización. Más aún, cuando menos una de las proteínas cuya síntesis se activa después de la fertilización al parecer se destruye cada vez que el embrión se divide y luego se resintetiza antes de la siguiente división.⁷ Estos datos fueron obtenidos fertilizando huevos en agua de mar que contenía ³⁵S-metionina y quitando las muestras a intervalos de 10 minutos, empezando 16 minutos después de la fertilización. Se prepararon extractos crudos de proteína a partir de las muestras y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida, y se determinó la localización de las proteínas marcadas en el gel mediante autorradiografía. Se observaron varias bandas prominentes en geles de extractos de huevos fertilizados que no eran evidentes en extractos comparables elaborados a partir de huevos no fertilizados. Una de las bandas (correspondiente a un polipéptido de 56 kD) que mostró mucha radiactividad en los primeros momentos después de la fertilización prácticamente desapareció del gel de 85 minutos después de la fertilización, lo que sugiere que la proteína fue descompuesta selectivamente. Esta misma banda reapareció después en geles de huevos fertilizados muestreados en momentos tardíos y luego desapareció una vez más en una muestra tomada a los 120 minutos después de la fertilización. La variación en la cantidad de esta proteína se grafica en la figura VE 14-6 (proteína banda A) junto con el índice de desdoblamiento, que indica el curso temporal de las primeras dos divisiones celulares. La descomposición de la proteína ocurre casi al mismo tiempo que la célula sufre la primera y segunda división. Se observó una proteína similar en los huevos de la almeja marina, otro invertebrado cuyos huevos se usan ampliamente para estudio. Estos investigadores denominaron "ciclina" a la proteína y observaron el notable paralelo en la conducta entre las variaciones de concentración de la ciclina determinada por electroforesis en gel y la actividad FPM determinada en los ensayos de desdoblamiento de la vesícula germinal en anfibios. Estudios subsecuentes demostraron que existen dos ciclinas distintas, A y B, las cuales son descompuestas en momentos diferentes durante el ciclo celular. La ciclina A se descompone durante un periodo de cinco a seis minutos, que se inicia justo antes de la transición de la metafase a la anafase, y la ciclina B se descompone pocos minutos después de esta transición.

El primer vínculo claro entre ciclina y FPM fue demostrado por Joan Ruderman y sus colegas, del Woods Hole Laboratory.⁸ En esos estudios se transcribió *in vitro* un RNAm que codifica ciclina A a partir de un fragmento de DNA clonado que contenía toda la secuencia codificadora de ciclina A. Se verificó la identidad de este RNAm permitiendo su traducción en un sistema *in vitro* sintetizador de proteínas donde demostró que codifica auténtica ciclina A de almeja. Cuando se inyectó la ciclina de RNAm en oocitos *Xenopus*, éstos respondieron

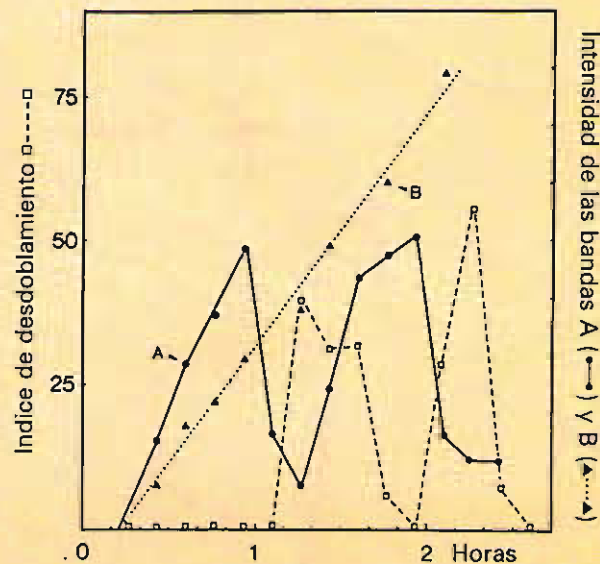


FIGURA VE 14-6. Correlación de la concentración de ciclina con el ciclo de división de la célula. Se fertilizó una suspensión de óvulos y después de seis minutos se añadió ³⁵S-metionina. Se tomaron muestras para analizar en electroforesis en gel a intervalos de 10 minutos, iniciando 16 minutos después de la fertilización. Se rastreó la autorradiografía de la electroforesis en gel para determinar la densidad de la marca y se construyó la gráfica mostrada. La proteína A, que varía según el ciclo celular, se denomina ciclina, y se muestra como círculos sólidos. La proteína B que no muestra variación con el ciclo celular, se grafica como triángulo sólido. El porcentaje de células que sufren división en cualquier momento se muestra como índice de división (cuadros abiertos). (Según T. Evans y cols. Cell 33:391, 1983, con permiso de Cell Press.)

sufriendo maduración según lo indica el desdoblamiento de la vesícula germinal y la condensación de cromosomas con un curso temporal no muy diferente del inducido por el tratamiento con progesterona (fig. VE 14-7). Estos resultados sugieren que la elevación de la ciclina A, que ocurre normalmente durante meiosis y mitosis, tiene un papel directo para promover la entrada a la fase M. A continuación la cantidad de ciclina A desciende rápidamente y se debe resintetizar antes de la siguiente división, o las células no podrán volver a entrar en fase M.

Pero ¿cuál es la relación entre ciclinas y FPM? Una de las dificultades para responder esta pregunta fue el uso de organismos diferentes. El FPM ha sido estudiado principalmente en anfibios, y las ciclinas en erizos de mar y almejas. Las pruebas indican que los oocitos de rana contienen una reserva de moléculas inactivas precursoras de FPM, las cuales se convierten a FPM activo durante la meiosis I. Por otra parte, la ciclina está totalmente ausente de los oocitos de almeja, pero aparece poco después de la fertilización. Una posibilidad considerada por Ruderman y sus colegas fue que la ciclina A es activador de FPM. Retornaremos a esto en breve.

Mientras tanto, en otra línea de investigación se intentó purificar y caracterizar la sustancia encargada de la actividad del factor promotor de maduración. En 1980, Michael Wu y

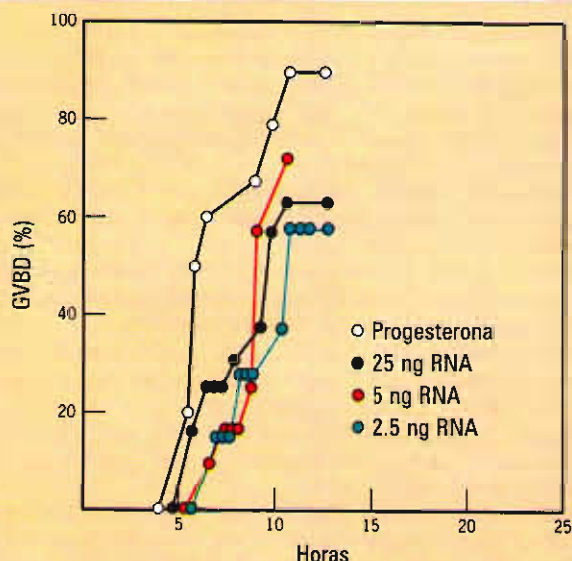


FIGURA VE 14-7. Cinética de la activación de un oocito de *Xenopus* por progesterona y RNAm de ciclina A. Se aislaron oocitos inmaduros grandes de fragmentos de ovario y se incubaron con progesterona o se les practicó microinyección con cantidades variables de ciclina A de RNAm. A las tres o cuatro horas después de la inyección se eliminaron los oocitos evidentemente dañados (casi dos a cuatro por grupo inicial de 20) y se permitió el desarrollo de los restantes (que representan el valor 100%). El desdoblamiento de la vesícula germinal (GVBD) y la activación del oocito fueron indicados por la formación de un punto blanco en la región del polo animal y confirmada por la disección de los oocitos. (Según K.I. Swenson, K.M. Farrell y V. Ruderman, *Cell* 47:865, 1986, con permiso de Cell Press.)

John Gerhart, de la Universidad de California, efectuaron una purificación de 20 a 30 veces la del FPM, precipitando la proteína en sulfato de amonio y sometiendo el material disuelto a cromatografía en columna. Cuando se inyectó el FPM parcialmente purificado al interior de oocitos receptores, estos investigadores observaron que, además de estimular la maduración del oocito, la inyección de FPM estimuló la incorporación de ^{32}P a las proteínas del oocito.⁹ Cuando se incubó la preparación de FPM purificado con ^{32}P -ATP *in vitro*, hubo fosforilación a nivel significativo de las proteínas presentes en la muestra, lo que indica la presencia de proteinasas activas en la preparación. Estos resultados sugieren que el FPM puede actuar por sí mismo como una proteinasa.

Experimentos subsiguientes confirmaron que el FPM purificado actúa como una proteinasa. Como se analiza en la sección 17-7, la purificación de una sustancia requiere de un ensayo capaz de identificar la fracción donde se encuentra la sustancia en cada paso del procedimiento de purificación. El ensayo usado para purificar FPM depende de una observación previa utilizando núcleos de espermatozoides desmembrados e incubados con extractos citoplásmicos de huevos *Xenopus*. Cuando se añadió FPM a dichos extractos, la cromatina del núcleo del espermatozoide se condensó como si entrara en fase M.¹⁰ Por medio de este ensayo, se purificó FPM más de 3 000 veces a partir de extractos de huevos de *Xenopus* mediante una serie de seis pasos cromatográficos sucesivos.¹¹ La activi-

dad FPM en estas preparaciones purificadas se relacionó consistentemente con dos polipéptidos, uno con peso molecular de 32 kD y el otro de 45 kD.

Además de estimular a los núcleos para prepararse para entrar en mitosis, el FPM purificado posee un elevado nivel de actividad de proteinasa según puede determinarse por la incorporación de radiactividad procedente de ^{32}P -ATP a las proteínas. Cuando se incubó la preparación purificada en presencia de ^{32}P -ATP, el polipéptido 45 kD resultó marcado. La preparación de FPM purificado también es capaz de fosforilar histona H1 añadida, lo que resulta significativo porque se cree que la fosforilación de esta proteína cromosómica desempeña un papel para iniciar la condensación de la cromatina antes de la mitosis (pág. 499).

A finales del decenio de 1980, los esfuerzos para descubrir el papel de las ciclinas y del FPM comenzaron a mezclarse con otra línea de investigación efectuada sobre levaduras. Se había demostrado que ambas especies de levaduras, las que se dividen por gemación y las que lo hacen por fisión, producen una proteinasa con peso molecular de 34 kD y cuya actividad es necesaria para que estas células entren en fase M (estudiada en la página 585). La proteína de la levadura se denominó p34^{cdc2} o simplemente cdc2. La primera demostración de un vínculo entre cdc2 y FPM provino como resultado de una colaboración entre grupos de investigadores sobre levaduras y anfibios.¹² Recordemos que estudios previos habían mostrado que la FPM contiene una proteína de 32 kD y otra de 45 kD. Los anticuerpos formados contra cdc2 a partir de levaduras que se reproducen por fisión reaccionaron específicamente con el componente de 32 kD del FPM aislado de huevos de *Xenopus*. Estos datos indican que este componente del FPM es un homólogo de la cinasa de 34 kD de la levadura, y por lo tanto el mecanismo encargado de controlar el ciclo de división celular en levaduras y vertebrados depende de componentes conservados a través de la evolución.

Un estudio similar empleando anticuerpos contra cdc2 de levadura demostró que la proteína homóloga en vertebrados no varía durante el ciclo celular.¹³ Esto apoya la hipótesis de que, en tanto que la proteína de 32 a 34 kD de las células de vertebrados actúa como proteinasa, su actividad depende de otra proteína. El candidato más probable para modulador es la ciclina, cuya concentración se eleva en cada ciclo celular y a continuación se destruye cuando la célula entra en anafase. Esta hipótesis se verificó posteriormente en varios estudios en los cuales se purificó el FPM de anfibios, almejas y estrellas de mar, y se analizó su composición de polipéptidos.¹⁴⁻¹⁶ En todos estos casos se demostró que el FPM activo presente en la fase M de las células es un complejo que consta de subunidades de dos tipos: 1) una subunidad de 34 kD que contiene el sitio activo de la proteinasa y es homólogo a la proteinasa cdc2 de levaduras, y 2) una subunidad mayor identificada como ciclina cuya presencia es necesaria para la actividad cinasa. Los estudios descritos en *La vía experimental* presente suministran un punto de vista integrado de la regulación del ciclo celular en todos los organismos eucariotas. Además, constituyen un marco para analizar el gran número de factores que controlan la actividad del FPM (cdc2) en varios puntos durante los ciclos celulares de levaduras y mamíferos, los cua-

les se han convertido en el foco de atención en los últimos años. Los datos más importantes de estos estudios recientes se analizan en la primera sección de este capítulo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gurdon, J.B. 1968. Changes in somatic cell nuclei inserted into growing and maturing amphibian oocytes. *J. Emb. Exp. Morphol.* 20:401-414.
2. Graham, C.F., Arms, K. y Gurdon, J.B. 1966. The induction of DNA synthesis by frog egg cytoplasm. *Dev. Biol.* 14:349-381.
3. Smith, L.D. y Ecker, R.E. 1971. The interaction of steroids with *R. pipiens* oocytes in the induction of maturation. *Dev. Biol.* 25:233-247.
4. Masui, Y. y Markert, C.L. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177:129-146.
5. Wasserman, W.J. y Smith, L.D. 1979. The cyclic behavior of a cytoplasmic factor controlling nuclear membrane breakdown. *J. Cell Biol.* 78:R15-R22.
6. Sunkara, P.S., Wright, D.A. y Rao, P.N. 1979. Mitotic factors from mammalian cells induce germinal vesicle breakdown and chromosome condensation in amphibian oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:2799-2802.
7. Evans, T. y cols. 1983. Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33:389-396.
8. Swenson, K.I., Farrell, K.M. y Ruderman, J.V. 1986. The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell* 47:861-870.
9. Wu, M. y Gerhart, J.C. 1980. Partial purification and characterization of the maturation-promoting factor from eggs of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 79:465-477.
10. Lohka, M.J. y Maller, J.L. 1985. Induction of nuclear envelope breakdown, chromosome condensation and spindle formation in cell-free extracts. *J. Cell Biol.* 101:518-523.
11. Lohka, M.J., Hayes, M.K. y Maller, J.L. 1988. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:3009-3013.
12. Gautier, J. y cols. 1988. Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* 54:433-439.
13. Labbe, J.C. y cols. 1988. Activation at M-phase of a protein kinase encoded by starfish homologue of the cell cycle control gene *cdc2+*. *Nature* 335:251-254.
14. Labbe, J.C. y cols. 1989. FPM from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of *cdc2* and one molecule of cyclin B. *EMBO J.* 8:3035-3058.
15. Draetta, G. y cols. 1989. *cdc2* protein kinase is complexed with both cyclin A and B: Evidence for proteolytic inactivation of FPM. *Cell* 56:829-838.
16. Gautier, J. y cols. 1990. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* 60:487-494.

SINOPSIS

Las etapas a través de las cuales pasa una célula desde una división celular a la siguiente constituyen el ciclo celular. El ciclo celular se divide en dos fases principales: fase M, que incluye el proceso de mitosis en el cual los cromosomas duplicados se separan en dos núcleos, y citocinesis, durante la cual toda la célula físicamente se divide en dos células hijas; e interfase. Típicamente, la interfase es mucho más prolongada que la fase M y se subdivide en tres fases distintas según el tiempo de duplicación, confinado a un periodo definido dentro del ciclo celular. G₁ es el periodo que sigue a la mitosis y precede a la duplicación; S es el periodo durante el cual ocurre la síntesis de DNA (y la síntesis de histonas); y G₂ es el periodo que sigue a la duplicación y precede al inicio de la mitosis. La división del ciclo celular y las fases que lo constituyen varían mucho de un tipo de célula a otro. Los sitios celulares pueden variar desde un tiempo tan corto como 30 minutos, aproximadamente, en los embriones de división rápida hasta un periodo de meses en tejidos de crecimiento muy lento. Ciertos tipos de células diferenciadas terminalmente, como el músculo esquelético de los vertebrados y las neuronas, han perdido por completo su capacidad para dividirse. La mayor parte de las actividades de síntesis diferentes de la síntesis del DNA y de las histonas continúa a través de la interfase, pero todas disminuyen notablemente o se interrumpen por completo durante la mitosis (p. 581).

El paso de una célula a través del ciclo es controlado por varios factores. La primera indicación de que el citoplasma

contiene factores que controlan el ciclo celular provino de estudios de fusión de células en diferentes etapas del ciclo. Estos estudios indican que una célula duplicante contiene uno o más factores que estimulan el inicio de la síntesis de DNA y que una célula mitótica contiene uno o más factores que inducen la condensación de la cromatina. Subsecuentes experimentos demostraron que la entrada de una célula en fase M se desencadena por activación de una proteincinasa llamada FPM (factor promotor de la maduración). El FPM consta de dos subunidades: una subunidad catalítica que transfiere grupos fosfato a residuos de serina y treonina específicos de sustratos de proteínas específicas, y una subunidad reguladora que consta de un miembro de una familia de proteínas llamadas ciclinas. La subunidad catalítica se denomina cinasa dependiente de ciclina (Cdk). Cuando la concentración de ciclina es baja, la cinasa carece de la subunidad ciclina y es inactiva. Cuando la concentración de ciclina alcanza un nivel suficiente, la cinasa se activa y desencadena la entrada de la célula en fase M (p. 582).

Las actividades que controlan el ciclo de la célula se centran principalmente en dos puntos: la transición entre G₁ y S, y la transición entre G₂ y la entrada en mitosis. El paso por cada uno de estos puntos requiere la activación transitoria de una Cdk por una ciclina específica. En levaduras, la misma Cdk es activa en las transiciones de G₁ a S y de G₂ a M, pero es estimulada por una ciclina diferente. La concentración de las diferentes ciclinas se eleva y desciende durante el ciclo celular como resultado de cambios en las tasas de síntesis y destruc-

ción de las moléculas de proteínas. Además de la regulación por ciclinas, la actividad Cdk también es controlada por el estado de fosforilación de la subunidad catalítica, que a su vez es controlada en las levaduras por dos cinasas cuando menos (CAK y wee1) y una fosfatasa (cdc25). En células de mamíferos, ocho ciclinas diferentes y una media docena de Cdk diferentes cuando menos desempeñan un papel en la regulación del ciclo celular (p. 584).

Las células poseen controles por retroalimentación que regulan el estado de los acontecimientos del ciclo celular, como duplicación y condensación de cromosomas, utilizando la información para determinar si el ciclo continúa o no. Las transiciones G₁-S y G₂-M son puntos donde se ejerce control primario. Por ejemplo, los factores de crecimiento exógeno influyen en las células que entran a la fase S a través de la actividad de una cinasa dependiente de ciclina. Si una célula se somete a tratamientos que dañen al DNA, el paso de G₁ a S se retrasa en tanto se repara el daño. La célula se puede detener en uno de los puntos de verificación del ciclo celular gracias a la acción de inhibidores cuya síntesis se estimula con acontecimientos como daño al DNA. Estos inhibidores a veces tienen varios blancos específicos, incluyendo las ciclinas Cdk, el mecanismo de duplicación y varios factores de transcripción que activan genes que participan en el crecimiento de las células. Una vez estimulada la célula por agentes externos que rebasan el punto de verificación G₁-S e inician la duplicación, la célula por lo general continúa sin estimulación externa adicional a través de la mitosis subsecuente (p. 586).

La mitosis asegura que los dos núcleos hijas reciban una dotación completa y equivalente de material genético. La mitosis se divide en profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. La profase se caracteriza porque prepara los cromosomas para ser separados y el ensamblado del mecanismo necesario para el movimiento de los cromosomas. Los cromosomas de la interfase se presentan en una configuración ampliamente extendida, en tanto que los cromosomas de la mitosis son estructuras muy condensadas en forma de bastoncillos. Se puede observar que cada cromosoma mitótico se desdobra longitudinalmente en dos cromátides, las cuales son duplicados recíprocos formados por duplicación durante la fase S previa. El proceso mediante el cual los cromosomas extendidos de la interfase se condensan para formar los cromosomas mitóticos es poco comprendido. Se cree que se desencadena por la activación de una cinasa dependiente de ciclina, que fosforila moléculas de histona H1 entre otros sustratos. La condensación del cromosoma requiere de la presencia de una topoisomerasa II activa, que es una proteína no histona principal del armazón mitótico del cromosoma. La principal constricción sobre el cromosoma mitótico marca el centrómero, que aloja una estructura en forma de plato, el cinetocoro, al cual se fijan los microtúbulos del huso. La primera etapa en la formación del huso en una célula animal típica es la aparición de microtúbulos en disposición de “flamas solares”, o áster, alrededor de cada uno de los dos centrómeros durante el inicio de la profase. La formación del áster va seguida por el movimiento de los centrosomas separándose entre sí en dirección a los polos. A medida que esto ocurre, los microtúbulos que se apartan aumentan en número y se alargan. Por último, los dos

centrosomas alcanzan puntos opuestos en la célula y establecen los dos polos. Algunos tipos de células, incluyendo las de plantas, ensamblan un huso mitótico en ausencia de centrosomas. El final de la profase está indicado por la fragmentación de la envoltura nuclear y la dispersión de sus membranas en forma de pequeñas vesículas (p. 588).

Durante la prometafase y la metafase, los cromosomas individuales se fijan primero a los microtúbulos del huso que surgen de ambos polos y luego se desplazan a un plano en el centro del huso. Al principio de la prometafase, los microtúbulos del huso en formación penetran en la región donde estuvo el núcleo y se fijan a los cinetocoros de los cromosomas condensados. Inicialmente se puede observar que los cromosomas se mueven activamente a lo largo de las superficies laterales de los microtúbulos, aparentemente impulsados por proteínas motoras localizadas en el cinetocoro. Sin embargo, pronto los cinetocoros se estabilizan al relacionarse con los extremos “más” de los microtúbulos cromosómicos procedentes de ambos polos del huso. Con el tiempo, cada cromosoma se mueve a una posición situada a lo largo de un plano en el centro del huso, proceso que se acompaña por el acortamiento de algunos microtúbulos debido a la pérdida de subunidades de tubulina y al alargamiento de otros debido a la adición de subunidades. Una vez que los cromosomas se alinean de manera estable, la célula ha llegado a la metafase. El huso mitótico de una célula animal típica en la metafase consta de microtúbulos astrales, que se irradian a partir del centrosoma; microtúbulos cromosómicos, unidos a los cinetocoros, y microtúbulos polares que se extienden desde el centrosoma más allá de los cromosomas y forman una canastilla estructural que mantiene la integridad del huso. Los microtúbulos del huso durante la metafase pueden mostrar actividad dinámica, según puede juzgarse por los movimientos dirigidos de las subunidades marcadas con fluorescencia (p. 593).

Durante la anafase y la telofase, las cromátides hermanas se separan entre sí hacia regiones aparte de la célula en división, y los cromosomas retornan a su condición de interfase. La anafase se inicia cuando las cromátides hermanas súbitamente se separan, proceso probablemente desencadenado por la actividad de una Cdk que requiere una topoisomerasa II. A continuación los cromosomas separados se mueven hacia sus respectivos polos acompañados por el acortamiento de los microtúbulos cromosómicos fijos, lo que ocasiona principalmente la pérdida neta de subunidades a nivel del cinetocoro. El movimiento de los cromosomas, llamado anafase A, generalmente se acompaña de alargamiento del huso mitótico y la consecuente separación de los polos, que se refiere como anafase B. La telofase se caracteriza por la reconstitución de la envoltura nuclear, dispersión de los cromosomas y restablecimiento de las redes citoplásmicas membranosas. Se cree que los motores microtubulares, como la cinecina y la dineína, generalmente se encargan de los movimientos durante la anafase, pero la despolimerización de los microtúbulos como mecanismo generador de fuerzas todavía permanece como posibilidad alternativa (p. 596).

La citocinesis, que es la división del citoplasma en dos células hijas, ocurre por constricción en células animales y por

construcción en células vegetales. Las células animales son estranguladas a la mitad por una indentación o surco que se forma en la superficie de la célula y se desplaza hacia adentro. El surco contiene una banda de filamentos de actina, los cuales tal vez se deslicen uno sobre otro, y avanza impulsado por filamentos pequeños de miosina II generadores de fuerza. Se cree que el sitio de la citocinesis se elige gracias a una señal que se difunde a partir de los polos del huso. En las células vegetales, la citocinesis tiene lugar por la construcción de una membrana celular y una pared celular en un plano situado entre los dos polos. El primer signo de la formación de una placa celular es la aparición de un material electrónicamente denso que forma grupos de microtúbulos entrelazados y dispersos. A continuación, pequeñas vesículas se desplazan hacia esa región y se alinean en un plano. Las vesículas se fusionan entre sí para formar cadenas largas sobre las cuales la membrana de las vesículas se convierte en membranas plasmáticas de las células adyacentes, y el material encerrado forma parte de la pared celular (p. 600).

La meiosis es un proceso que incluye dos divisiones nucleares en secuencia, produciendo núcleos hijas haploides que contienen un solo miembro de cada par de cromosomas homólogos, reduciendo así el número de cromosomas a la mitad. La meiosis puede ocurrir en diferentes etapas del ciclo de vida de la célula, según el tipo de organismo. Para garantizar que cada núcleo hija sólo tiene un conjunto de homólogos, ocurre un elaborado proceso de formación de pares de cromosomas durante la profase I que no tiene contraparte en la mitosis. La formación de pares cromosómicos se acompaña por la formación de una estructura proteinácea en forma de escalera denominada complejo sinaptonémico (CS). La cromatina de cada homólogo está íntimamente relacionada con una de las barras laterales del complejo sinaptonémico. Al formarse los pares de cromosomas homólogos se participa en la recombinación genética que produce cromosomas con nuevas

combinaciones de alelos maternos y paternos. En etapas subsecuentes, los cromosomas se condensan aún más, pero los homólogos permanecen fijos entre sí en puntos específicos denominados quiasmas, que se cree que representan sitios donde ocurre la recombinación en etapa previa. En los oocitos y espermatocitos de muchas especies animales, los cromosomas se dispersan durante la profase I para formar cromosomas lampbrush, que son sitios de expresión genética extensa. Los pares de homólogos (llamados bivalentes o tétradas) se orientan a nivel de la placa metafásica de modo que ambas cromátides de un cromosoma enfrentan el mismo polo. Durante la anafase I, los cromosomas homólogos se separan. Puesto que no hay interacción entre una tétrada y otra, los cromosomas maternos y paternos de cada tétrada se apartan entre sí de manera independiente. Las células, que ahora tienen un contenido haploide en el cromosoma, progresan hasta la segunda división meiótica durante la cual las cromátides hermanas de cada cromosoma se separan en diferentes núcleos hijas (p. 604).

La recombinación genética durante la meiosis ocurre como resultado del rompimiento y reunión de las cadenas de DNA de diferentes homólogos de una tétrada. La recombinación es un proceso mal comprendido en el cual las regiones homólogas sobre diferentes cadenas de DNA se intercambian sin adición ni pérdida de un solo par de bases. En paso inicial, dos dúplex próximos a recombinarse se alinean uno a continuación del otro como resultado de una búsqueda de homología. Una vez alineados ocurre el rompimiento en alguna de ambas cadenas de uno de los dúplex. En los siguientes pasos, las cadenas de DNA de un dúplex invaden el otro dúplex formando una estructura interconectada. Los pasos subsecuentes pueden incluir la actividad de nucleasas y polimerasas para generar y llenar brechas en las diferentes cadenas, similar a lo que ocurre durante la reparación del DNA (p. 613).

PREGUNTAS DE REPASO

- ¿Qué es el ciclo celular? ¿Cuáles son las etapas del ciclo celular? ¿Cómo varía el ciclo celular entre los diferentes tipos de células?
- Describir cómo se puede usar la ^3H -timidina y la autorradiografía para determinar la duración de los diferentes periodos del ciclo celular.
- ¿Cuál es el efecto de fusionar una célula en G_1 con una en S ; de fusionar una célula en fase G_1 con una en M ; de fusionar una célula en fase G_2 o S con una en M ?
- ¿Cómo puede variar la actividad del FPM a través del ciclo celular? ¿Cómo se correlaciona esto con la concentración de ciclinas? ¿Cómo afecta la concentración de ciclina a la actividad del FPM? ¿Qué factores determinan el nivel de una ciclina particular en cualquier momento determinado del ciclo?
- ¿Cuál es la relación entre el producto del gen *cdc2* de una levadura y la subunidad catalítica del FPM?
- ¿Qué significa punto de verificación del ciclo celular? ¿Cuál es su importancia? ¿Cómo puede una célula detener su avance en uno de estos puntos de verificación?
- ¿Cuál es el papel del producto del gen *p53*? ¿Cómo actúa este producto en las células? ¿Cuál es su relación con *p21*? ¿En qué difieren las células de un paciente con ataxia-telangiectasia (AT) de las células normales?
- Contrastar el papel íntegro de la mitosis y la meiosis en la vida de las plantas y los animales. ¿En qué difieren los núcleos formados por estos dos procesos?
- ¿Cómo preparan los sucesos de la profase en la mitosis a las cromátides para su posterior separación durante la anafase?
- ¿Cuáles son algunas de las actividades del cinetocoro durante la mitosis?
- Describir lo que ocurre en una célula durante la prometafase y durante la metafase.

12. ¿Qué tipos de mecanismos generadores de fuerza pueden encargarse del movimiento de cromosomas durante la anafase?
13. Comparar lo que ocurre durante la citocinesis en células típicas de plantas y animales.
14. Comparar los acontecimientos que tienen lugar durante la profase I y la profase II de la meiosis.
15. ¿Cómo se demostró que la recombinación genética tiene lugar por un mecanismo de rompimiento y reunión? Describir una serie de pasos mediante los cuales el DNA de dos cromosomas homólogos pueden sufrir recombinación.

PREGUNTAS ANALÍTICAS

1. ¿De qué manera se vincula la división celular entre humanos y células eucariotas primitivas?
2. ¿Qué tipos de acontecimientos de síntesis esperaría usted que ocurrieran en G_1 que no ocurren en G_2 ?
3. Supongamos que se marca una población de células en crecimiento asincrónico con 3H -timidina. G_1 es de seis horas, S de seis horas, G_2 de cinco horas, y M de una hora. ¿Qué porcentaje de las células estarán marcadas luego de un pulso de 15 minutos? ¿Qué tiempo tendría que seguirse a estas células antes de observar algún cromosoma mitótico marcado? ¿Qué porcentaje de las células presentan cromosomas mitóticos marcados si las células se siguen durante 18 horas?
4. Supongamos que se tiene un cultivo de las mismas células empleadas en la pregunta previa, pero en lugar de un pulso para marcarlas con 3H -timidina se marcan continuamente durante 20 horas. Trazar una gráfica que muestre la cantidad de DNA radiactivo que estaría presente en el cultivo después de un periodo de 20 horas. ¿Cuál sería el tiempo mínimo necesario para garantizar que todas las células han incorporado algo de radiactividad en el experimento de arriba? ¿Cómo se puede determinar la duración del ciclo celular en este cultivo sin usar marcas radiactivas?
5. Fusionando células en fase G_1 y S se producen resultados diferentes a los obtenidos cuando se fusionan células en fase G_2 con otras en fase S. ¿Qué diferencia sería de esperar y cómo se puede explicar?
6. Cuando alguno de los genes que codifican *CAK*, *wee1* y *cdc25* sufre mutaciones, ¿cuál sería de esperar que detuviera la división continua de una célula? ¿Sería de esperar que cuando sufran mutaciones puedan provocar la proliferación descontrolada de la célula?
7. ¿Por qué se requiere que ambas copias del gen *p53* sufran mutación antes que una célula pierda el control de su crecimiento?
8. Un sincitio es una "célula" que contiene más de un núcleo; ejemplos son la fibra muscular esquelética y una blástula del embrión de mosca. Estos dos tipos de sincitio se originan por dos vías muy diferentes. ¿Cuáles son los dos mecanismos que podría visualizar que dieran como resultado la formación de estos sincitios? ¿Cuáles son los datos que le dan a conocer acerca de la relación entre mitosis y citocinesis?
9. ¿Qué tipo de anticuerpo se puede inyectar dentro de una célula para bloquear la compactación de cromosomas?
10. Cuando se añade 3H -timidina a una célula que está sufriendo duplicación (fase S) antes del inicio de la meiosis, ¿qué porcentaje de los cromosomas de los gametos producidos quedarán marcados? Si uno de estos gametos, en este caso el espermatozoide, fertiliza un óvulo no marcado, ¿qué porcentaje de los cromosomas de la etapa de dos células quedarán marcados?
11. Si el número de cromosomas haploides en el hombre es de 23 y la cantidad de DNA haploide es 1C, ¿cuántos cromosomas tiene una célula en la siguientes etapas: metafase de la mitosis, profase I de la meiosis, anafase I de la meiosis, profase II de la meiosis, anafase II de la meiosis? ¿Cuántas cromátides tiene la célula en cada una de estas etapas? ¿Cuánto DNA (en términos de números de C) tiene la célula en cada una de estas etapas?
12. Graficar la cantidad de DNA en el núcleo de una espermatogonia en etapa G_1 antes de la primera división meiótica a través de toda la meiosis. Marcar cada una de las principales etapas del ciclo celular y de la meiosis sobre la gráfica.
13. ¿Cuántos centríolos tiene una célula en la metafase de la mitosis?
14. Supongamos que usted piensa que la mayor parte de los casos de trisomía son resultado del envejecimiento de un óvulo en el oviducto en tanto espera la fertilización. ¿Qué tipo de datos se podrían obtener examinando fetos abortados que confirmen esta sugerencia? ¿Cómo concordaría esto con los datos ya recopilados?
15. Supongamos que se incuba una célula meiótica en 3H -timidina entre las etapas leptoteno y cigoteno, a continuación se fija la célula durante el paquíteno y se prepara una autorradiografía. Se observa que los quiasmas son sitios donde se concentran gránulos plateados. ¿Qué conclusión se puede obtener acerca del mecanismo de recombinación?

BIBLIOGRAFIA

El ciclo celular

Downes, C.S. y Wilkins, A. 1994. Cell cycle checkpoints, DNA repair and DNA replication strategies. *Bioess.* 16:75-79.

Dunphy, W.G. 1994. The decision to enter mitosis. *Trends Cell Biol.* 4:202-207.

Marx, J. 1993. How *p53* supresses cell growth. *Science* 262:1644-1645.

- Marx, J. 1995. Cell cycle inhibitors may help brake growth as cells develop. *Science* 267:963-964.
- Morgan, D.O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* 374:131-134.
- Murray, A.W. y Hunt, T. 1993. *The Cell Cycle: An Introduction*. Oxford University Press.
- Nigg, E.A. 1993. Cellular substrates of p34^{cdc2} and its companion cyclin-dependent kinases. *Trends Cell Biol.* 4:296-301.
- Norbury, C. y Nurse, P. 1992. Animal cell cycles and their control. *Ann. Rev. Biochem.* 61:441-470.
- O'Farrell, P.H. 1992. Cell cycle control: Many ways to skin a cat. *Trends Cell Biol.* 2:159-163.
- Peters, G. 1994. Stifled by inhibitions. *Nature* 371:204-205.
- Pines, J. 1994. p21 inhibits cyclin shock. *Nature* 369:520-521.
- Pines, J. 1994. Ubiquitin with everything. *Nature* 371:742-743.
- Pines, J. 1994. Arresting developments in cell-cycle control. *Trends Biochem. Sci.* 19:143-145.
- Sherr, C.J. 1993. Mammalian G₁ cyclins. *Cell* 73:1059-1065.
- Sherr, C.J. 1995. D-type cyclins. *Trends Biochem. Sci.* 20:187-190.
- Solomon, M.J. 1994. The functions of CAK, the p34^{cdc2}-activating kinase. *Trends Biochem. Sci.* 19:496-503.
- Mitosis y citocinesis**
- Brinkley, B.R. 1991. Chromosomes, kinetochores, and the microtubule connection. *Bioess.* 13:675-681.
- Brinkley, B.R. y cols. 1992. Structure and molecular organization of the centromere-kinetochore complex. *Trends Cell Biol.* 2:15-21.
- Earnshaw, W.C. y Tomkiel, J.E. 1992. Centromere and kinetochore structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:86-93.
- Earnshaw, W.C. y Pluta, A.F. 1994. Mitosis. *Bioess.* 16:639-643.
- Epstein, H. y Scholey, J.M. 1992. Kinesis in the spindle. *Trends Cell Biol.* 2:315-318.
- Gelfand, V.I. y Scholey, J.M. 1992. Every motion has its motor. *Nature* 359:480-482.
- Gorbsky, G.J. 1992. Chromosome motion in mitosis. *Bioess.* 14:73-80.
- Hepler, P.K. 1992. Calcium and mitosis. *Int. Rev. Cytol.* 138:239-268.
- Holm, C. 1994. Coming undone: How to untangle a chromosome. *Cell* 77:955-957.
- Hunt, T. y Kirschner, M. eds. 1993. *Cell Multiplication. Curr. Opin. Cell Biol.* 5:163-237.
- Hyams, J.S. y Lloyd, C.W. eds. 1994. *Microtubules*. Wiley-Liss, pp. 393-412.
- Kellogg, D.R., Moritz, M. y Alberts, B.M. 1994. The centrosome and cellular organization. *Ann. Rev. Biochem.* 63:639-674.
- McIntosh, J.R. y Koonce, M.P. 1989. Mitosis. *Science* 246:622-628.
- McIntosh, J.R. y Hering, G.E. 1991. Spindle fiber action and chromosome movement. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7:403-426.
- Murray, A.W. y Kirschner, M. 1989. Dominoes and clocks: The union of two views of the cell cycle. *Science* 246:614-621.
- Nicklas, R.B. 1988. The forces that move chromosomes in mitosis. *Ann. Rev. Biochem. Biop. Cyt.* 17:431-449.
- Rieder, C.L. 1991. Mitosis: Toward a molecular understanding of chromosome behavior. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3:59-66.
- Roth, S.Y. y Allis, C.D. 1992. Chromatin condensation: Does histone H1 dephosphorylation play a role? *Trends Cell Biol.* 17:93-98.
- Satterwhite, L.L. y Pollard, T.D. 1992. Cytokinesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:42-52.
- Saunders, W.S. 1993. Mitotic spindle pole separation. *Trends Cell Biol.* 3:432-437.
- Schulman, I. y Boom, K.S. Centromeres: An integrated protein/DNA complex required for chromosome movement. *Ann. Rev. Cell Biol.* 7:311-336.
- Smirnova, E.A. y Bajer, A.S. 1992. Spindle poles in higher plant mitoses. *Cell Motil. Cytoskel.* 23:1-7.
- Meiosis y no disyunción**
- Albertini, D.F. 1992. Regulation of meiotic maturation in the mammalian oocyte. *Bioess.* 14:97-103.
- Chandley, A.C. 1988. Meiosis in man. *Trends Genet.* 4:79-84.
- Schmekel, K. y Daneholt, B. 1995. The central region of the synaptonemal complex revealed in three-dimensions. *Trends Cell Biol.* 5:239-242.

Señales celulares: comunicación entre células y su ambiente

15-1 Algunas características básicas de los sistemas de señales celulares

15-2 Receptores acoplados a proteína G y segundos mensajeros

La perspectiva humana: Trastornos relacionados con receptores acoplados a proteína G

15-3 Receptor de tirosincinasas (RTK): un segundo tipo principal de sistemas de señales

15-4 Convergencia, divergencia e interferencia entre diferentes sistemas de señales

15-5 Otros sistemas de señales

La vía experimental: Descubrimiento y caracterización de las proteínas enlazadas a GTP

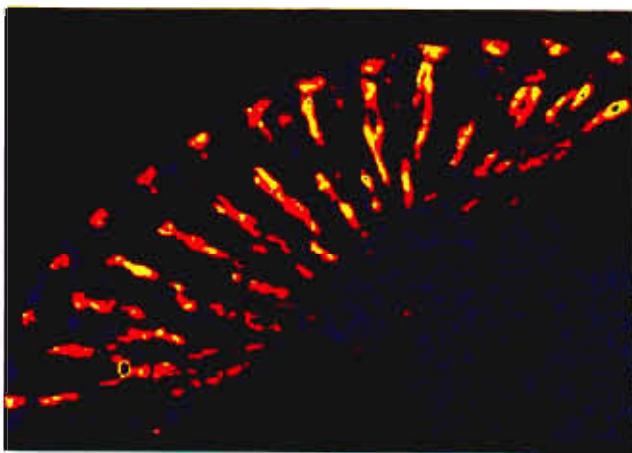


FIGURA 15-A. Corte a través del ojo compuesto de la mosca de la fruta teñido con anticuerpos fluorescentes para mostrar la distribución de la proteína calmodulina enlazada a calcio. (Cortesía de Jeffrey A. Porter y Craig Montell, The Johns Hopkins University.)

El poeta inglés John Donne expresó su convicción respecto de la interdependencia del ser humano en la frase: “Ningún hombre es una isla.” Lo mismo se puede decir de las células. Es evidente que las células dependen de su ambiente para obtener las materias primas necesarias que sostienen su vida. En el capítulo 4 vimos que la membrana plasmática de la célula contiene varios canales diferentes y transportadores que permiten a las células introducir selectivamente las sustancias inorgánicas y orgánicas necesarias para mantenerse y para liberar productos de desperdicio. Para su supervivencia también es esencial que las células se comuniquen con sus vecinas, vigilar las condiciones de su ambiente y responder de manera apropiada a diversos tipos de estímulos que inciden sobre su superficie. Las células llevan a cabo estas interacciones mediante un fenómeno conocido como **emisión de señales celulares**, en el cual se pasa información a través de la membrana plasmática al interior de la célula y con frecuencia al núcleo celular (fig. 15-1). En la mayor parte de los sistemas las señales celulares incluyen:

- Reconocimiento del estímulo en la superficie externa de la membrana plasmática mediante un receptor específico integrado a la membrana.
- Transferencia de una señal a través de la membrana plasmática hacia la superficie citoplásmica de la misma.

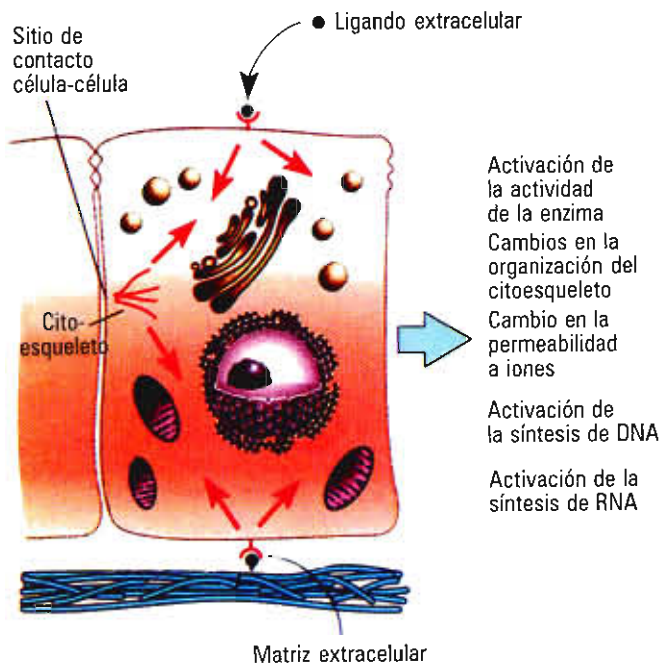


FIGURA 15-1. Perspectiva de algunas formas como se pueden iniciar las señales intercelulares y los tipos de respuesta que pueden generar. La membrana plasmática de una célula contiene receptores que se enlazan específicamente a ligandos solubles, matrices extracelulares y componentes de la superficie de otras células. La estimulación que se origina a partir de estos contactos se puede convertir (transducir) por la membrana celular en señales intracelulares transmitidas a lo largo de diversas vías. Finalmente, estas señales pueden producir la activación de enzimas, cambios en la organización del citoesqueleto, cambios en la permeabilidad iónica, inicio de la síntesis de DNA, o la activación o represión de la expresión de genes.

- Transmisión de la señal a las moléculas efectoras específicas sobre la superficie interna de la membrana o dentro del citoplasma que desencadenan la respuesta celular, la cual puede implicar un cambio en la expresión de genes, alteración de la actividad en enzimas metabólicas, reconfiguración del citoesqueleto, cambio de permeabilidad a iones, activación de la síntesis de DNA o incluso la muerte de la célula.
- Cese de la respuesta como resultado de la destrucción o inactivación de la molécula emisora de señales combinada con disminución del grado de estímulo extracelular.

Antes de examinar estos pasos con mayor detalle debemos hacer notar que no toda la información se transmite desde el espacio extracelular al interior de la célula por medio de un receptor situado en la superficie de la misma. Por ejemplo, en el capítulo 12 vimos que las hormonas esteroideas actúan sobre células específicas que atraviesan la membrana plasmática por difusión e interactúan con una proteína receptora dentro de la célula, a la cual convierten en factor de transcripción activo. En el presente capítulo describiremos otro ejemplo donde un mensajero intercelular, denominado óxido nítrico (NO), atraviesa la membrana

plasmática en vez de actuar a nivel de la superficie celular. También hay casos en los cuales las sustancias que se enlazan a los receptores de la superficie celular evocan una respuesta directa sin iniciar la emisión de señales dentro de la célula. El neurotransmisor acetilcolina actúa por un mecanismo de este tipo cuando se enlaza a su receptor sobre la célula del músculo esquelético, abriendo un canal iónico situado entre el propio receptor (pág. 163).

La emisión de señales puede afectar casi a todos los aspectos de la estructura y función celulares, y ésta es una de las principales razones por las cuales este capítulo aparece casi al final del libro. Por otra parte, el tema de la emisión de señales celulares puede servir para vincular varias actividades celulares, al parecer independientes. Ningún otro tema parece ilustrar el hecho de que las partes de una célula son elementos interdependientes e incapaces de funcionar en aislamiento. La emisión de señales celulares también está íntimamente relacionada con el proceso mediante el cual las células regulan su crecimiento y función, y este hecho confiere al estudio de las señales celulares importancia especial para comprender de qué manera una célula puede perder el control de su crecimiento y convertirse en tumor maligno.

15-1 Algunas características básicas de los sistemas de señales celulares

El término “emisión de señales celulares” lleva implícito el concepto de que la célula responde a un estímulo de su ambiente transmitiendo información al compartimiento interno de la célula. En la mayor parte de los casos, el estímulo es una molécula secretada en el espacio extracelular por otra célula, pero el estímulo también se origina como resultado del contacto con otra célula o con un sustrato no celular (fig. 15-1). Cualquiera que sea su naturaleza, el agente que se enlaza al receptor en la superficie externa de la célula se conoce como *ligando*.

A diferencia de la captación de nutrientes o de iones, las señales celulares no incluyen la transferencia del agente estimulante a través de la membrana; todo lo que se transmite a través de dicha membrana es la señal de que se ha recibido un estímulo. Otro término comúnmente empleado en relación con este proceso es **transducción de señales**, que indica que la naturaleza del estímulo recibido por el receptor de la superficie celular es totalmente diferente a la señal liberada en el interior de la célula.

Como pronto veremos, la transducción de señales es un proceso complejo que implica el paso de información a lo largo de **vías de transducción de señales**, en general constituidas por una serie de diversas proteínas. En ciertos aspectos, el paso de información a través de la célula es análogo al paso de electrones a lo largo de una cadena de transporte de electrones. En ambos casos, cada componente de la vía es alterado por el elemento “antecedente” en ella, y a su vez altera al elemento “subsecuente” en dicha vía. En vez de pasar electrones o alguna otra sustancia específica, las proteínas de una vía de transducción de señales por lo general actúan alterando la conformación de la siguiente proteína en la serie, acontecimiento que activa o inhibe a dicha proteína (fig. 15-2).

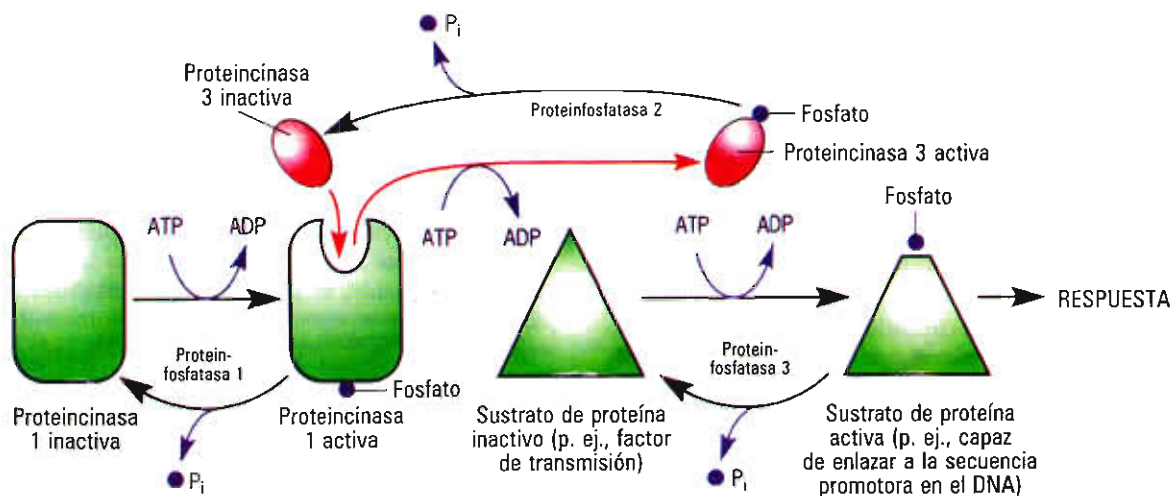


FIGURA 15-2. Las vías para transducción de señales constan principalmente de proteincinasas y proteinfosfatasa cuya acción catalítica cambia la conformación, y por lo tanto la actividad, de las proteínas que modifican. En el ejemplo aquí mostrado, la proteincinasa 1 es activada por la proteincinasa 2. Una vez activada, la proteincinasa 1 fosforila a la proteincinasa 3 activando la enzima. En seguida, la proteincinasa 3 fosforila un factor de transcripción incrementando su afinidad por un sitio sobre el DNA que provoca la respuesta. Cada una de estas etapas de activación puede ser invertida por una fosfatasa.

No es sorprendente, luego de leer otros temas de biología celular, que los mecanismos más importantes para que una proteína de una vía de transducción de señales altere la actividad de la proteína siguiente en la serie sea añadir o eliminar grupos fosfato (fig. 15-2). Como veremos, la vía de transducción de señales de ordinario contiene proteincinasas y fosfatasa, que parecen ser los agentes favoritos para provocar cambios reversibles rápidos en la actividad celular. Algunas de estas cinasas y fosfatasa son proteínas citoplásmicas solubles; otras son proteínas integrales de membrana. Algunas de estas enzimas poseen gran número de proteínas como sustratos, en tanto que otras sólo fosforilan o desfosforilan un sustrato de proteína único. Gran parte de los sustratos de estas enzimas son otras enzimas, pero los sustratos de proteína pueden incluir canales iónicos, factores de transcripción y varios tipos de subunidades reguladoras. En general, añadir o eliminar grupos fosfato a partir del sustrato desencadena un cambio de conformación en la proteína que estimula o inhibe su actividad, y por lo tanto conduce a una respuesta específica.

Otra característica prominente de las vías de señales celulares compartida por otros procesos celulares es el uso de proteínas enlazadas a GTP como interruptores que inician o concluyen la actividad. Las proteínas enlazadas a GTP se estudiaron en relación con el tráfico de vesículas en el capítulo 6, la dinámica de microtúbulos y microfilamentos en el capítulo 9, y la síntesis de proteínas en el capítulo 11. En el presente capítulo exploraremos su papel en la transmisión de mensajes a lo largo de "circuitos de información celular". El análisis de la emisión de señales celulares en este capítulo se centrará en dos tipos contrastantes de vías de transducción de señales (fig. 15-3). En uno de los tipos de vías, la fijación de un ligando a un receptor en la superficie celular se indica a través de la activación de una proteína enlazada a GTP (**proteína G**), en tanto que en el otro tipo de

respuesta, el enlace de ligandos se señala mediante activación directa de la actividad enzimática relacionada con el receptor.

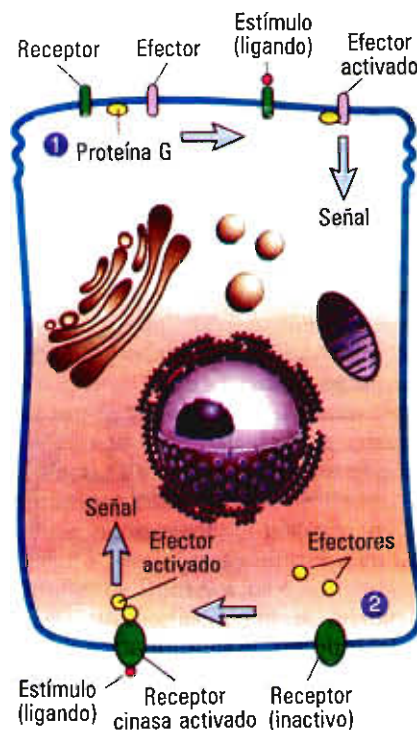


FIGURA 15-3. Los dos tipos alternativos de vías para la transducción de señales. En la vía 1, el ligando enlazado activa una proteína G, que activa un efector, liberando una señal. En la vía 2, el ligando enlazado activa una acción enzimática (cinasa) del receptor, que activa un efector liberando una señal.

15-2 Receptores acoplados a proteína G y segundos mensajeros

La oxidación de la glucosa por la vía catabólica de la glucólisis y del ciclo de Krebs suministra a la mayor parte de las células su fuente primaria de energía. Dada la importancia de la glucosa en el metabolismo, la comprensión del mecanismo que controla el aprovechamiento de este azúcar ha sido un objetivo importante de los bioquímicos y fisiólogos por más de 100 años.

Como se estudió en el capítulo 3, la glucosa en los animales se almacena como glucógeno, un polímero insoluble de glucosa. La desintegración del glucógeno en subunidades ricas en energía es controlada en vertebrados por algunas hormonas, más notablemente el glucagon, secretado por el páncreas, y la epinefrina, secretada por la médula suprarrenal. Cada una de estas hormonas se enlaza a un receptor que sobresale en la membrana plasmática de la célula específica. El enlace inicia una serie de reacciones que estimulan la enzima fosforilasa, la cual cataliza la reacción para descomponer el glucógeno en glucosa fosfato, primer paso del catabolismo del azúcar (fig. 15-4). Al mismo tiempo, el enlace de ambas hormonas inhibe a la enzima glucógeno sintasa, que cataliza la reacción opuesta para polimerizar glucosa y formar glucógeno. Por lo tanto, los diferentes tipos de estímulo que inciden en la misma célula blanco pueden inducir la misma respuesta. En la siguiente sección veremos de qué manera es posible esto.

Descubrimiento de un segundo mensajero: AMP cíclico

La conexión entre el enlace de una hormona a la membrana plasmática y los cambios de actividad de la fosforilasa y la glucógeno sintasa fue dilucidado mediante estudios iniciados a mediados del decenio de 1950 por dos grupos de investigadores: Earl Sutherland y sus colegas, en la Case Western Reserve University, y Edwin Krebs y Edmond

Fischer, en la Universidad de Washington. El objetivo de Sutherland era desarrollar un sistema *in vitro* en el cual se pudiera lograr la respuesta fisiológica a una hormona. Luego de grandes esfuerzos, observó que se podía incubar epinefrina o glucagon con una preparación de células *despedazadas* y demostrar activación de la fosforilasa. Esta preparación de células despedazadas se podía dividir mediante centrifugación en una fracción con partículas y una fracción soluble. Aunque la fosforilasa sólo se encuentra en la fracción sobrenadante, se requieren las partículas materiales para la respuesta hormonal. Experimentos subsiguientes indicaron que la respuesta ocurre en dos pasos distintos cuando menos. Si se aísla la fracción de partículas de un homogenado de hígado y se incuba con la hormona, se produce alguna sustancia nueva que cuando se añade a la fracción sobrenadante puede activar a la molécula fosforilasa soluble. Sutherland identificó a la sustancia liberada por las membranas de la fracción dividida como monofosfato de adenosina cíclico (AMP cíclico, o simplemente AMPc). Como estudiaremos en detalle, el AMPc estimula la movilización de la glucosa al activar una proteincinasa que añade un fosfato a un residuo específico de serina del polipéptido fosforilasa.

El AMP cíclico es un ejemplo de **segundo mensajero**, sustancia liberada dentro de la célula como resultado del enlace de un primer mensajero, una hormona u otro ligando, a un receptor situado en la superficie externa de la célula. Subsecuentes trabajos efectuados por otros investigadores demostraron que el AMP cíclico sólo es uno de un gran número de sustancias que actúan como segundos mensajeros en células eucariotas. En tanto que el primer mensajero se enlaza exclusivamente a una sola especie de receptor, el segundo mensajero generado en el citoplasma a menudo puede activar varias actividades celulares. Como resultado, el uso de segundos mensajeros permite a las células mostrar una respuesta coordinada a gran escala luego de la estimulación por un solo ligando extracelular. En un momento retornaremos al mecanismo mediante el cual la señal del ligando enlazado se transmite a través de la membrana,

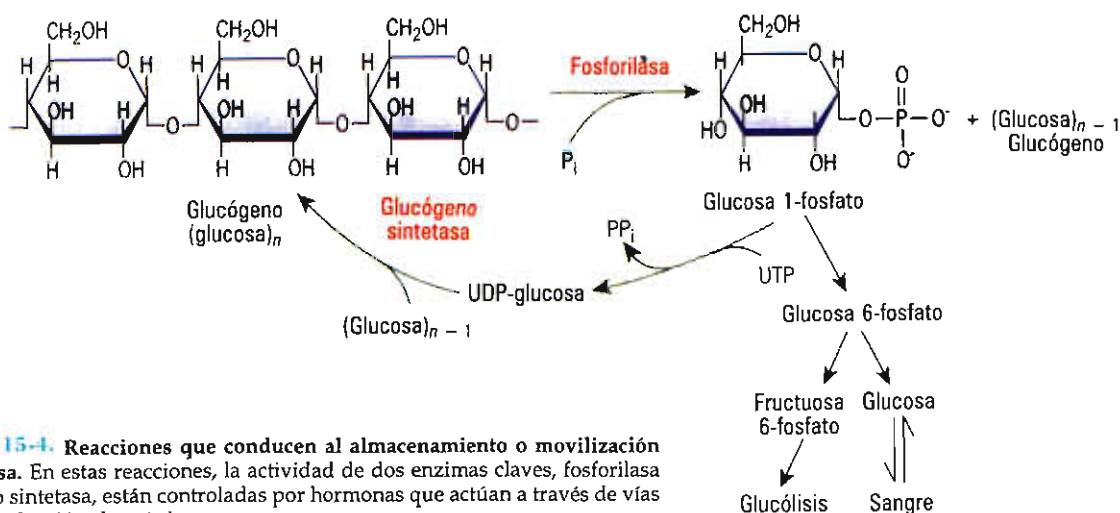


FIGURA 15-4. Reacciones que conducen al almacenamiento o movilización de la glucosa. En estas reacciones, la actividad de dos enzimas claves, fosforilasa y glucógeno sintetasa, están controladas por hormonas que actúan a través de vías para la transducción de señales.

que es uno de los principales pasos en el proceso de emisión de señales, pero primero ilustraremos el mecanismo de acción de los sistemas con segundo mensajero para describir de qué manera se sintetiza el AMP cíclico y cómo puede desencadenar la movilización de glucosa.

Movilización de glucosa: ejemplo de respuesta inducida por AMPc

Una proteína integral de membrana sintetiza el AMPc. Esta proteína se denomina adenililciclase y su dominio catalítico reside en la superficie interna de la membrana plasmática (fig. 15-5). Puesto que provoca la respuesta celular (efectos) mediante la síntesis de AMPc, la adenililciclase se denomina **efector**. El enlace de glucagon o de epinefrina a la superficie externa de una célula hepática provoca un cambio de conformación del receptor que es transmitido a través de la membrana plasmática y, según se describe más adelante, activa la adenililciclase en la superficie interna de la membrana. Una vez activada la adenililciclase, cataliza la conversión de ATP en moléculas de AMPc que pueden difundir rápidamente al interior del citoplasma (fig. 15-5).

El AMPc provoca su respuesta iniciando una cadena de reacciones, varias de las cuales incluyen modificación por enlaces covalentes de una enzima por otra. Esta *reacción en cascada* se ilustra en la figura 15-6. Ya se describió el primer

paso en la cascada de reacciones que ocurre a medida que la hormona se enlaza al receptor y estimula la síntesis de AMPc (pasos 1 y 2, fig. 15-6). Cada molécula de AMPc puede entonces enlazarse a un sitio alostérico sobre la subunidad reguladora de una proteínacinasa específica dependiente de AMPc, denominada *proteínaquinasa A* (PKA) (paso 3). Las subunidades reguladoras normalmente inhiben la actividad enzimática de las subunidades catalíticas de la enzima. El enlace del AMPc provoca disociación de las subunidades inhibitoras liberando las subunidades catalíticas en su forma activa. Los sustratos específicos de PKA de una célula hepática incluyen dos enzimas que desempeñan un papel crucial en el metabolismo de la glucosa, la glucógeno sintasa y la fosforilasa cinasa (pasos 4 y 5). La fosforilación de la glucógeno sintasa inhibe su actividad catalítica y por lo tanto evita la conversión de glucosa a glucógeno. Por lo contrario, la fosforilación de la fosforilasa cinasa activa la enzima para catalizar la transferencia de grupos fosfato a moléculas de fosforilasa (paso 6). Krebs y Fischer descubrieron que la adición de un solo grupo fosfato a un residuo serina específico en la molécula de fosforilasa activa a esta enzima y estimula el desdoblamiento de glucógeno (paso 7). La glucosa 1-fosfato formada en la reacción de la fosforilasa se convierte a glucosa, que difunde al interior de la sangre y alcanza los tejidos del cuerpo (paso 8).

Uno de los grandes valores de la reacción en cascada, como la mostrada en la figura 15-6, es que amplifica ampliamente el mensaje original (indicado por las flechas azules en la figura 15-6). En la sangre, la concentración de hormonas por lo general es muy baja: menos de 10^{-8} M. Considerando el volumen de sangre en el cuerpo de un vertebrado, esta concentración baja constituye una señal de comunicación muy económica. El enlace de una sola molécula de hormona en la superficie de la célula puede activar varias moléculas de adenililciclase, cada una de las cuales produce numerosos mensajeros AMPc en un breve periodo. Por lo tanto, la producción del segundo mensajero representa un importante paso de amplificación en el proceso. Cada molécula de AMPc puede entonces activar una sola molécula de PKA, que puede fosforilar a un gran número de moléculas de PKA, las cuales a su vez pueden fosforilar un número aún mayor de moléculas de fosforilasa, que por su parte catalizan la formación de un número mucho mayor de fosfatos de glucosa. Así, lo que comienza como un estímulo apenas perceptible en la superficie de la célula, rápidamente se transforma en una gran movilización de glucosa dentro de ella.

Otros aspectos de la vía de transducción de señales del AMPc

Aunque los efectos más rápidos y mejor estudiados de la producción de AMPc se observan en el citoplasma, el núcleo y sus genes también participan en la respuesta. La mayor parte de las moléculas PKA activadas permanecen en el citoplasma, pero una fracción de ellas se transloca al interior del núcleo donde fosforilan proteínas nucleares clave (paso 9, fig. 15-6), en particular un factor de transcripción denominado CREB (*siglas en inglés que significan elemento enlazado a proteínas que responde al AMPc*). La versión fosforilada del CREB se enlaza a diferentes sitios sobre el

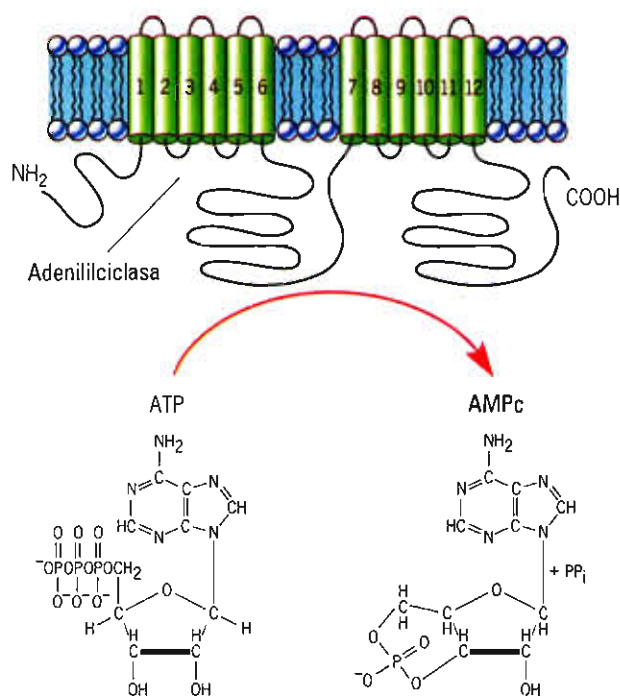


FIGURA 15-5. La formación de AMP cíclico a partir de ATP es catalizada por adenililciclase, una proteína integral de membrana cuyo sitio activo se localiza en la superficie interna de la membrana. La actividad de la enzima es regulada por proteínas enlazadas a GTP, según se estudia más adelante en el texto y se ilustra en la figura 15-11. La desintegración del AMPc (no mostrado) se logra gracias a una fosfodiesterasa, que convierte el nucleótido cíclico a 5' monofosfato.

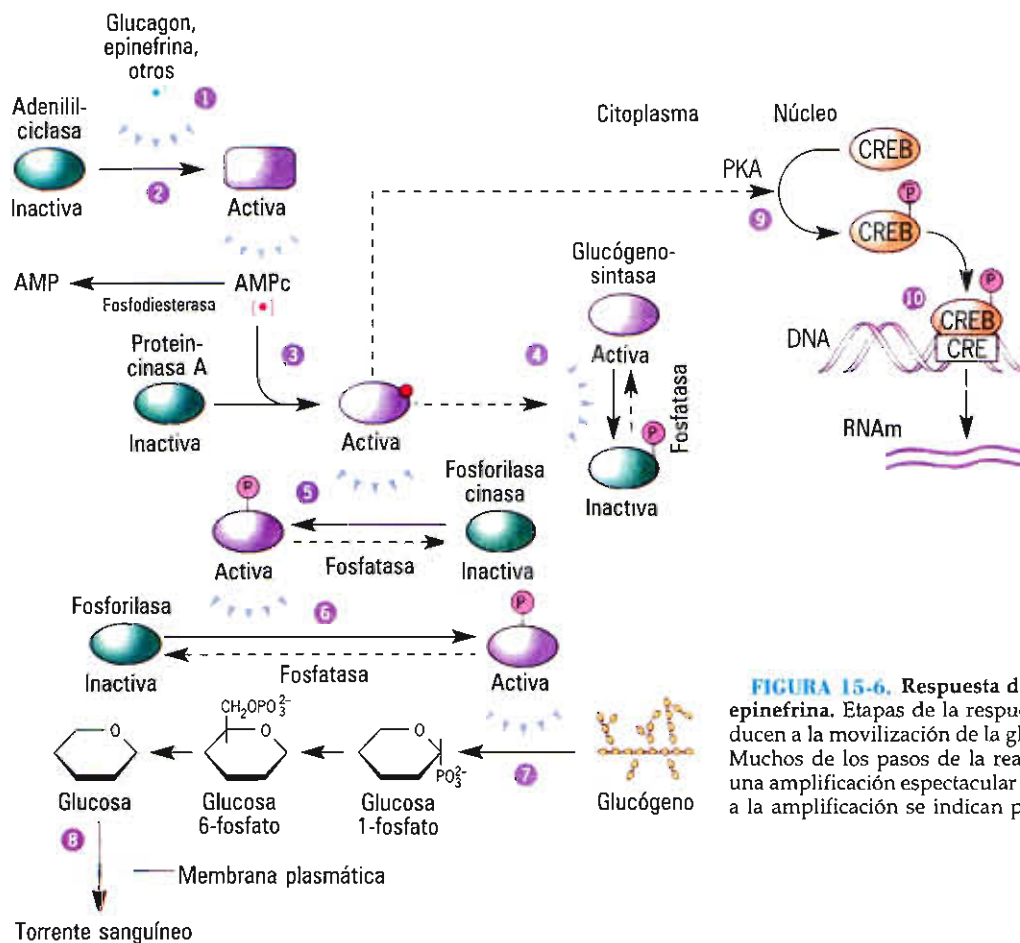


FIGURA 15-6. Respuesta de una célula hepática a glucagón o epinefrina. Etapas de la respuesta al estímulo hormonal que conducen a la movilización de la glucosa, según se describe en el texto. Muchos de los pasos de la reacción en cascada se acompañan de una amplificación espectacular de la señal. Los pasos que conducen a la amplificación se indican por flechas azules.

DNA (paso 10) que contienen una secuencia particular de nucleótidos (TGACGTC) conocida como amplificador regulado de AMPc (ARA). De la página 518, recordemos que los amplificadores son sitios en el DNA donde los factores de transcripción enlazados actúan para incrementar la velocidad de inicio de la transcripción. Se cree que los factores de transcripción enlazados a los amplificadores actúan al enlazarse a las proteínas presentes en el complejo preinicial cerca del sitio de comienzo (fig. 12-36). Los amplificadores regulados de AMPc se localizan específicamente en regiones reguladoras del DNA que controlan la expresión de genes que desempeñan un papel en la respuesta al AMPc. En las células del hígado, por ejemplo, varias de las enzimas que participan en la gluconeogénesis, vía por la cual se forma la glucosa a partir de los intermediarios de la glucólisis (fig. 3-29), son codificadas por genes que contienen ARA cercanos. Por lo tanto, epinefrina y glucagón no sólo activan enzimas catabólicas participantes en el desdoblamiento de glucógeno, sino también conducen a la síntesis de enzimas anabólicas necesarias para formar glucosa a partir de precursores más pequeños.

Como sería de esperar, debe haber un mecanismo para revertir los pasos mostrados en la figura 15-6; de otra manera, la célula permanecería en estado activado a partir de ese

momento. Las células hepáticas contienen varias fosfatasa que catalizan la eliminación de los grupos fosfato añadidos por las cinasas. La más importante de estas enzimas, la fosfatasa-1, puede eliminar fosfatos de todas las enzimas fosforilables de la figura 15-6: fosforilasa cinasa, glucógeno sintasa y fosforilasa.

Otra ventaja de una reacción en cascada, además de la amplificación, es que cada una de las enzimas a lo largo de la cadena, sea cinasa o fosfatasa, es un sitio potencial donde la célula puede regular la respuesta celular. Por ejemplo, la tasa de actividad de fosfatasa-1 es controlada por una proteína denominada inhibidor-1, que también sufre un ciclo de activación y desactivación por fosforilación y desfosforilación, respectivamente (fig. 15-7). La fosforilación del inhibidor-1 es catalizada por la proteína-cinasa A, la misma cinasa dependiente de AMPc mencionada anteriormente. La activación de esta cinasa asegura que cuando los niveles de AMPc se elevan, la fosfatasa-1 se inhibe. Sin embargo, tan pronto como desciende la concentración de AMPc, el inhibidor se desfosforila y por lo tanto activa a la fosfatasa-1, que elimina el fosfato de la fosforilasa y detiene la descomposición adicional de glucógeno.

El AMPc se produce en muchas células diferentes en respuesta a una gran variedad de ligandos diferentes (es

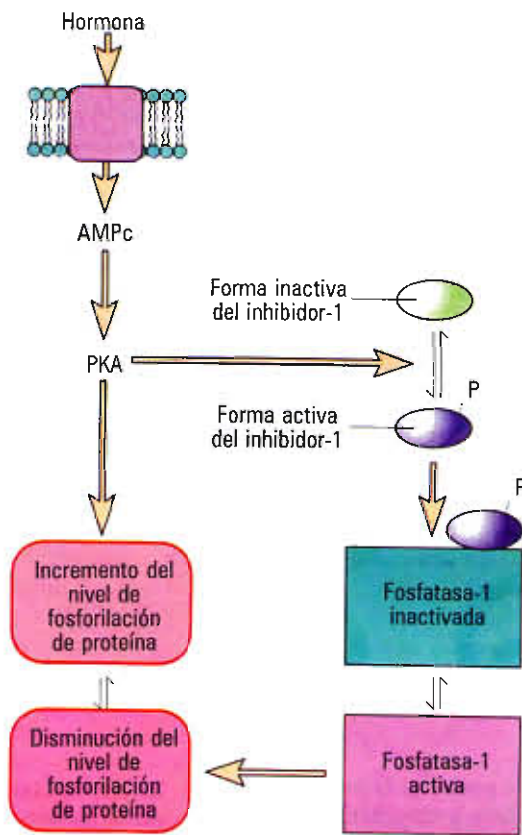


FIGURA 15-7. Papel como fosforilador y desfosforilador del inhibidor-1 en la acción hormonal. La formación de AMPc y la activación subsecuente de la proteínasa dependiente de AMPc (PKA) provoca: 1) aumento del nivel de la fosforilación de proteína y 2) fosforilación y activación del inhibidor-1, que a su vez provoca inactivación de la fosfatasa-1, por lo que mantiene así el mayor nivel de fosforilación de proteína. Un descenso en la síntesis de AMPc conduce a la inversión de este estado.

decir, primeros mensajeros). En el cuadro 15-1 se presentan algunas respuestas mediadas por AMPc en células de mamíferos. En invertebrados también se emplea el AMPc como segundo mensajero, según se ilustra por la elevación espectacular de la concentración de AMPc que ocurre en ciertas células nerviosas de la liebre marina en respuesta al neurotransmisor serotonina (fig. 15-8).

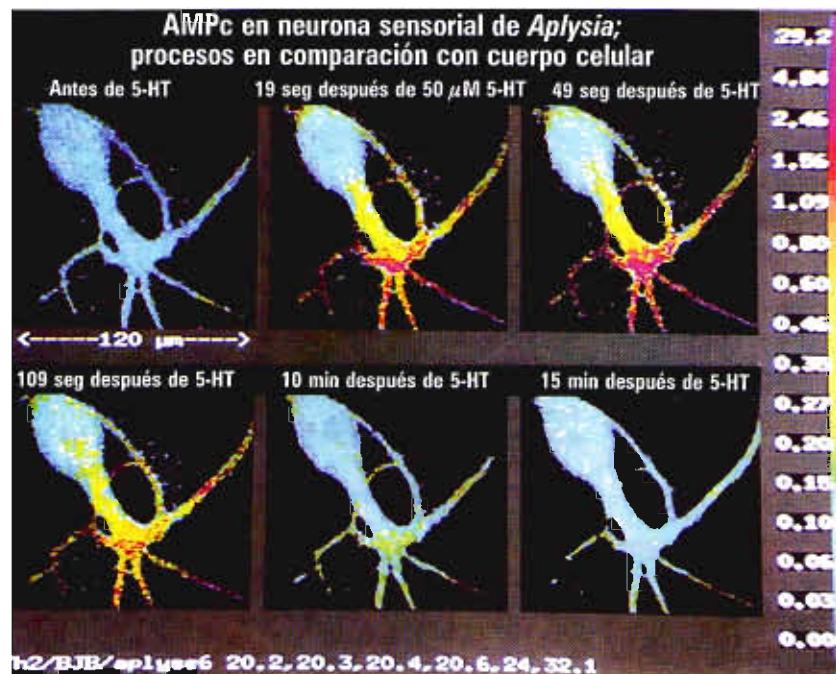
Puesto que el AMPc ejerce su efecto por activación de PKA, el curso de los acontecimientos que ocurren en una célula dada en respuesta al AMPc será determinado por las proteínas específicas fosforiladas por dicha enzima (fig. 15-9 y cuadro 15-2). Aunque la activación del PKA en una célula hepática en respuesta a la epinefrina produce descomposición de glucógeno, la activación de esta enzima en una célula del túbulo renal en respuesta a vasopresina provoca reducción de la permeabilidad de la membrana al agua, y en las células tiroideas en respuesta a TSH provoca la secreción de hormona tiroidea. La misma hormona también puede producir respuestas muy diferentes en distintas células, aun cuando se enlace al mismo receptor. Por ejemplo, la epinefrina se enlaza a un receptor β -adrenérgico similar en las células hepáticas, células adiposas y células del músculo liso del intestino, provocando la síntesis de AMPc en los tres tipos de células. Sin embargo, las respuestas son muy diferentes: en la célula hepática se desintegra glucógeno, en las células adiposas se desintegran triacilglicérols, y las células del músculo liso se relajan.

En todos los casos citados antes, la producción de AMPc continúa sólo si se mantiene alta la concentración del mensajero primario en el espacio extracelular. Cuando la concentración desciende y estas moléculas se disocian de los receptores de membrana de las células blanco, se desactiva la adenililciclase y la síntesis de AMPc desciende de manera aguda (según se ilustra en la última fotografía de la secuencia en la figura 15-8). Las moléculas de AMPc ya presentes en el citoplasma se degradan por acción de una enzima, la fosfodiesterasa de nucleótido cíclico, que concluye la respuesta.

CUADRO 15-1. Ejemplos de respuestas inducidas por hormonas mediadas por AMPc

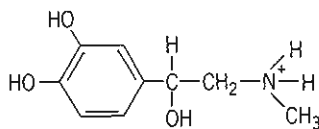
Tejido	Hormona	Respuesta
Hígado	Epinefrina y glucagon	Hidrólisis de glucógeno, síntesis de glucosa (gluconeogénesis), inhibición de la síntesis de glucógeno
Músculo esquelético	Epinefrina	Hidrólisis de glucógeno, inhibición de la síntesis de glucógeno
Músculo cardíaco	Epinefrina	Incremento de la contractilidad
Adiposo	Epinefrina, ACTH y glucagon	Catabolismo del triacilglicérol
Renal	Vasopresina (ADH)	Incremento de la permeabilidad de las células epiteliales al agua
Tiroideo	TSH	Secreción de hormona tiroidea
Hueso	Hormona paratiroidea	Incremento de la resorción de calcio
Ovario	LH	Incremento de la secreción de hormonas esteroideas
Corteza suprarrenal	ACTH	Incremento de la secreción de glucocorticoide

FIGURA 15-8. Demostración experimental de la síntesis de AMPc en respuesta a estimulación específica. Esta serie de fotografías muestran una célula nerviosa sensorial de la liebre marina *Aplysia*. La concentración de AMPc libre (indicada en μM por la barra de color en el lado derecho de la ilustración) se midió por microinyección de una molécula fluorescente cuyo espectro de emisión es sensible a la concentración de AMPc. La imagen superior izquierda muestra la concentración intracelular de AMPc en la neurona no estimulada, y las siguientes cuatro imágenes muestran los efectos de la estimulación por el neurotransmisor serotonina (5-hidroxitriptamina) en los tiempos indicados. Cuando las células se lavan para liberarlas de serotonina, la concentración de AMPc retorna a las cifras presentes cuando no hay estimulación. (Reimpreso con permiso de Brian J. Backsai y cols., *Science* 260:223, 1993; copyright 1993 American Association for the Advancement of Science.)



Estructura y función de receptores acoplados a proteína G

El glucagon es una pequeña proteína de 29 aminoácidos; la epinefrina es una pequeña amina hidrófila



sintetizada a partir del aminoácido tirosina. Estas dos moléculas prácticamente no tienen nada en común desde el punto de vista estructural, pero ambas activan al mismo efector (adenililciclase), que conduce a la síntesis de AMPc y la subsecuente fosforilación de la fosforilasa. La similitud de la respuesta al enlace de estas dos hormonas se puede atribuir a la semejanza de sus mecanismos de acción. Los receptores de estos dos ligandos muy diferentes son miembros de la misma familia de proteínas integrales de membrana, caracterizadas por siete hélices α que atraviesan la membrana (fig. 15-10). Los segmentos transmembrana están conectados entre sí por asas extracelulares cortas sobre la superficie externa de la membrana, y asas intracelulares cortas sobre la superficie interna de la misma. Los dos receptores difieren entre sí sobre todo en la estructura de la bolsa que se enlaza al ligando sobre la superficie extracelular del receptor, que es específica para una u otra hormona.

No sólo los dos receptores son muy similares en cuanto a estructura; también lo son las proteínas que transmiten la señal del receptor enlazado al ligando al efector de adenililciclase. La transmisión de la señal del receptor al efector se logra mediante un tercer elemento del sistema de transduc-

ción, una proteína G heterotrimérica (fig. 15-10), cuyo descubrimiento y caracterización se analizan en *La vía experimental*, al final del capítulo. Estas proteínas se conocen como proteínas G porque se enlazan al nucleótido de guanina, sea GDP o GTP. Se describen como heterotriméricas porque

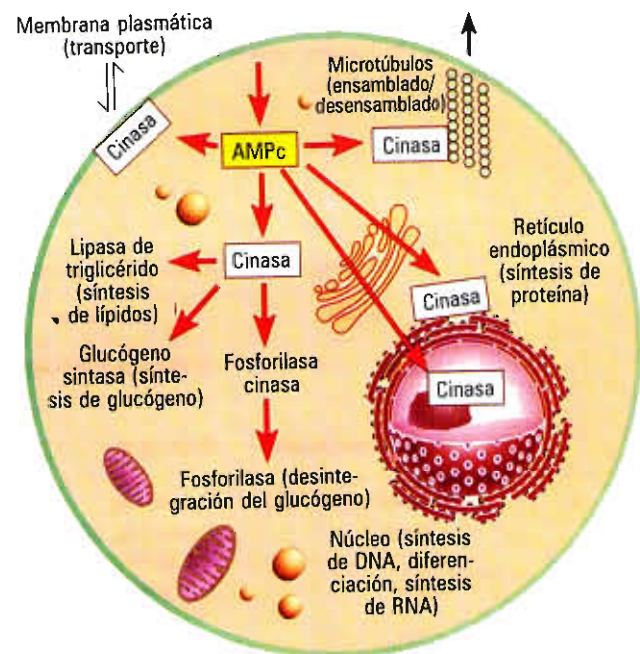


FIGURA 15-9. Ilustración esquemática de los diferentes procesos que se pueden afectar por los cambios de concentración del AMPc. Todos estos efectos son mediados por la activación de una o varias proteincinasas.

CUADRO 15-2. Muestra de sustratos PKA conocidos

Glucógeno sintasa muscular (1a).
 Fosforilasa cinasa α
 Proteínfosfatasa-1
 Piruvatoquinasa
 CREB
 Tirosina hidroxilasa hepática
 Receptor δ de acetilcolina
 Inhibidor-1 de la proteínfosfatasa
 Proteína ribosómica S6
 Troponina de corazón de conejo
 Hormona sensible a lipasa
 Fosfofructocinasa
 Miosincinasa de cadena ligera
 Fructosa bifsosfatasa
 Fosforilasa cinasa β
 Sintasa de glucógeno muscular
 Acetil CoA carboxilasa

FUENTE: D.A. Walsh y S.M. van Patten, *FASEB J.* 8:1234, 1994.

todas ellas constan de tres subunidades distintas de polipéptido, denominadas α , β y γ . Esta propiedad las distingue de otro tipo de proteína G que estudiaremos más adelante en este capítulo y que consta de una sola subunidad. Cada proteína G puede existir en dos estados: un estado activo en el cual la subunidad α de la proteína G se enlaza a una molécula de GTP o un estado inactivo en el cual la subunidad α se enlaza a una molécula de GDP. Como veremos en breve, las proteínas heterotriméricas G alternan hacia atrás

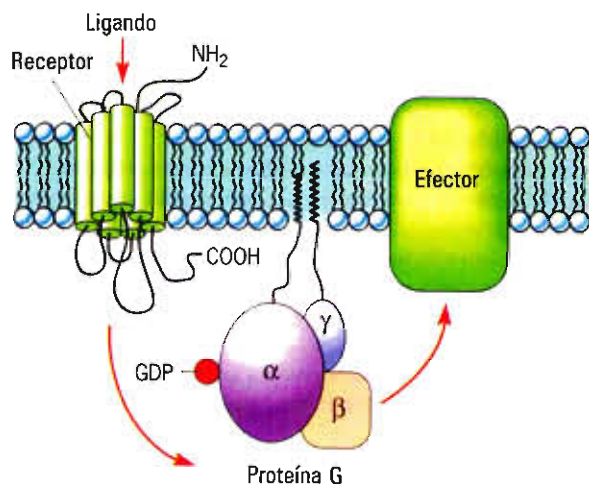


FIGURA 15-10. Mecanismo enlazado a la membrana para la transducción de señales por medio de un receptor transmembrana de siete hélices y la proteína G heterotrimérica. Los receptores de este tipo, incluyendo los que se enlazan a epinefrina y glucagon, contienen siete hélices que atraviesan la membrana. Cuando se enlaza a su ligando, el receptor interactúa con una proteína G trimérica que a su vez sirve para activar a un efector, como la adenililciclase.

y adelante entre dos estados que dependen de las condiciones prevalecientes.

La conexión funcional entre un receptor transmembrana de siete hélices y una proteína G heterotrimérica parece ser un mecanismo universal mediante el cual un estímulo extracelular inicia la movilización de un segundo mensajero en células eucariotas. Se han identificado más de 100 diferentes **receptores acoplados a proteína G** en organismos que van desde levaduras hasta plantas y animales evolutivamente elevadas. Estos receptores responden a una variada disposición de hormonas, neurotransmisores, feromonas (sustancias químicas transmitidas de un miembro a otro de una especie), odorantes (moléculas detectadas por receptores olfatorios que despiertan el sentido del olfato), y fotones (los receptores de la retina que detectan la luz son miembros de esta misma familia de moléculas receptoras). En el cuadro 15-3 se presenta una lista de algunos ligandos que operan por medio de esta vía y los efectores a través de los cuales actúan.

En todos los casos examinados hasta la fecha, la estimulación de receptores acoplados a proteínas G sigue una secuencia similar de elementos, según se indica en la figura 15-11 y se describe a continuación.

1. **Activación de la proteína G por el receptor.** El enlace de los ligandos a su receptor específico provoca un cambio de conformación del receptor que aumenta su actividad por la proteína G. Esta es la única función del ligando extracelular. Como resultado del cambio de conformación, el receptor enlazado al ligando se enlaza a la proteína G sobre la superficie interna de la membrana formando un complejo de proteína G-receptor (paso 1, fig. 15-11). La interacción entre el receptor y la proteína G es mediada por varias asas intracelulares en la superficie interna del receptor. La interacción con el receptor provoca que la subunidad α de la proteína G libere su GDP enlazado y se enlaze a un sustituto de GTP (paso 2), que cambia a la proteína G para llevarla a su estado activo (fig. 15-12). Mientras se encuentre en su estado activado, un solo receptor puede activar a varias moléculas sucesivas de proteína G, lo que suministra el primer paso en la amplificación de la vía.
2. **Transmisión de la señal de la proteína G al efector.** El intercambio de nucleótidos de guanina modifica la conformación de la subunidad G_α , lo que provoca su disociación del receptor y de las otras dos subunidades de la proteína G, las cuales permanecen juntas como un complejo $G_{\beta\gamma}$ (paso 3, fig. 15-11). Cada subunidad G_α disociada (con su GTP fijo) está libre para activar una molécula efectora, como la adenililciclase, que pone en operación al sistema del segundo mensajero (paso 4).¹ En tanto el complejo G_α -GTP permanezca enlazado a una molécula de adenililciclase (de ordinario en cuestión de segundos), la enzima continúa produciendo

¹ Se conocen ejemplos en los cuales la subunidad α de la proteína G inhibe la actividad del efector en vez de estimularla, pero estos casos no serán analizados.

CUADRO 15-3. Ejemplo de procesos fisiológicos mediados por proteína G

Estímulo	Receptor	Efecto	Respuesta fisiológica
Epinefrina	Receptor β -adrenérgico	Adenilil ciclasa	Desdoblamiento de glucógeno
Serotonina	Receptor a serotonina	Adenilil ciclasa	Conducta de sensibilización y aprendizaje en <i>Aplysia</i>
Luz	Rodopsina	Fosfodiesterasa GMPc	Excitación visual
Complejos IgE-antígeno	Receptor IgE de células cebadas	Fosfolipasa C	Secreción
Péptido f-Met	Receptor quimiotáctico	Fosfolipasa C	Quimiotaxia
Acetilcolina	Receptor muscarínico	Canal de potasio	Enlentecimiento de la actividad de marcapaso

Adaptado de L. Stryer y H.R. Bourne, reproducido con permiso de *The Annual Reviews of Cell Biology*, vol. 2, © 1986 por Annual Reviews Inc.

moléculas de AMPc (paso 5). Se cree que la subunidad formada por el complejo $G_{\beta\gamma}$ actúa independientemente de G_{α} activando otros efectores subsecuentes, y suministrando una vía para transmitir señales adicionales hacia una célula específica.

3. **Las señales se retroalimentan a través de la membrana.** En algunos casos cuando menos, la disociación de la subunidad G_{α} del receptor modifica la conformación del mismo de modo que pierde su afinidad por el ligando, el cual se disocia de su sitio de enlace. Por lo tanto, el receptor no sólo transmite una señal al interior del ligando de la proteína G, sino que también recibe una señal que pasa hacia afuera de la proteína G activada.
4. **Fin de la respuesta.** La subunidad G_{α} disociada tiene su propia actividad catalítica; actúa como GTPasa, que hidroliza la GTP enlazada formando GDP enlazada (paso 6, fig. 15-11). Puesto que la hidrólisis del GTP suprime la capacidad de la subunidad para activar moléculas efectoras adicionales, la subunidad α es por lo tanto capaz de inactivarse a sí misma. Una vez que la GTP se hidroliza, el complejo G_{α} -GDP puede reasociarse a las subunidades $G_{\beta\gamma}$ para reconstituir el complejo trimérico y retornar el sistema al estado de reposo (paso 7). La toxina del cólera (producida por la bacteria *Vibrio cholerae*) ejerce su efecto modificando la subunidad G_{α} e inhibiendo su actividad GTPasa en las células del epitelio intestinal. Como resultado, las moléculas de adenililciclase permanecen en la modalidad activada, batiendo el AMPc, lo que provoca la secreción de grandes volúmenes de líquido intestinal al interior de la luz del intestino. La pérdida de agua relacionada con esta respuesta inapropiada casi siempre provoca la muerte a causa de deshidratación.

En *La perspectiva humana* de este capítulo se analizan los efectos de ciertas mutaciones en la función de receptores acoplados a proteína G.

Especificidad de las respuestas acopladas a proteína G

Es evidente que una gran variedad de agentes, incluyendo hormonas, neurotransmisores y estímulos sensoriales, pueden usar mecanismos similares para transmitir información

a través de la membrana plasmática y desencadenar una gran diversidad de respuestas celulares. Por ejemplo, el AMP cíclico puede producir respuestas totalmente diferentes en distintas células debido a que este segundo mensajero activa una proteína cinasa capaz de fosforilar varios conjuntos de proteínas presentes en distintos tipos de células. También puede haber considerable especificidad en el "extremo delantero" de la vía respecto de diferentes receptores y proteínas G. Puede haber un receptor para un ligando determinado en diferentes versiones (isoformas) que se cree tienen distinta afinidad con el ligando y también afinidad diversa para una proteína G particular. Por ejemplo, los investigadores han identificado nueve isoformas del receptor adrenérgico (el receptor que enlaza epinefrina) y 15 isoformas del receptor para serotonina, un neurotransmisor potente liberado por las células nerviosas en determinadas porciones del cerebro que gobiernan las emociones. Las isoformas de un receptor pueden coexistir en la misma membrana plasmática o a veces aparecen en las membranas de diferentes tipos de células específicas. Las proteínas G heterotriméricas que transmiten señales de receptor a efector también pueden existir en múltiples formas. Cuando menos se han identificado 20 subunidades G_{α} , cinco subunidades G_{β} y siete subunidades G_{γ} diferentes.

Se supone que diversas combinaciones de subunidades específicas sirven para construir proteínas G que muestran diferentes propiedades en sus reacciones, tanto con receptores como con efectores. Se puede demostrar, por ejemplo, que un solo receptor puede activar más de una vía de señales en la misma célula. El receptor β -adrenérgico, por ejemplo, puede activar adenililciclase y estimular la abertura de canales de Ca^{2+} , lo que conduce a un estado fisiológico en el cual se pueden producir respuestas por AMPc y Ca^{2+} activados.

Como se mencionó en la nota al pie de la página 635, algunas proteínas G actúan inhibiendo a sus efectores. Que una proteína G sea estimuladora (proteína G_s) o inhibidora (proteína G_i) depende de la naturaleza de la subunidad alfa. El mismo estímulo puede activar una proteína G_i en una célula y una proteína G_s en otra célula. Por ejemplo, cuando la epinefrina se enlaza a un receptor β -adrenérgico sobre una célula hepática, activa una proteína G_s , que esti-

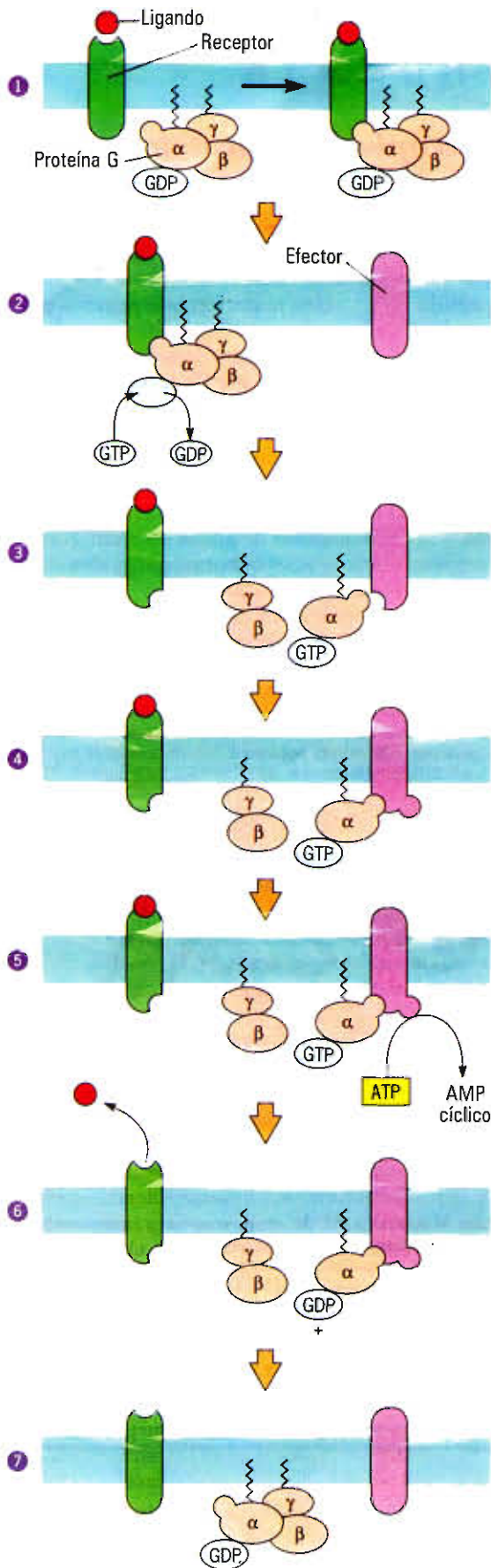


FIGURA 15-11. Mecanismo de activación (o inhibición) mediado por receptor de los efectores a través de proteínas G heterotriméricas. En el paso 1, el ligando se enlaza al receptor alterando su conformación e incrementando su afinidad por la proteína G a la cual se enlaza. En el paso 2, la subunidad G_α intercambia GDP por GTP. En el paso 3, la subunidad G_α se disocia del complejo $G_{\beta\gamma}$. En el paso 4, la subunidad G_α se enlaza al efector (en este caso, la adenililciclase) activando el efector. En el paso 5, la adenililciclase produce AMPc. En el paso 6, la actividad GTPasa de G_α hidroliza el GTP enlazado, desactivando a G_α . En el paso 7, G_α se vuelve a asociar a $G_{\beta\gamma}$, reconstituyendo la proteína G trimérica, y el efector cesa su actividad.

mula la producción de AMPc. Por lo contrario, cuando la epinefrina se enlaza a un receptor α -adrenérgico sobre una célula de músculo liso, se activa una proteína G_i que inhibe la producción de AMPc.

Otros segundos mensajeros

El AMPc fue el primer segundo mensajero que se descubrió, y todavía se están descubriendo las respuestas que desencadena. Algunas otras vías para transducción de señales pueden ser activadas por receptores acoplados a proteína G. En las siguientes secciones exploraremos unos pocos ejemplos.

Fosfatidilinositol derivado de segundos mensajeros

Cuando el neurotransmisor acetilcolina se enlaza a superficies de una célula de músculo liso que reviste un vaso sanguíneo, estimula a dicha célula muscular a contraerse estrechando el diámetro del vaso. Cuando un antígeno extraño se enlaza a la superficie de una célula cebada, estimula a la célula a secretar histamina, una sustancia que puede desen-

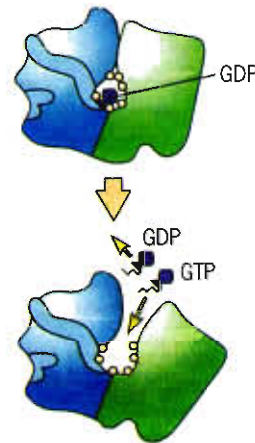


FIGURA 15-12. Modelo para el cambio de conformación de una proteína G que estimula el intercambio GDP-GTP. En este modelo, el enlace del receptor a la subunidad G_α afloja la red solidaria de enlaces de hidrógeno (círculos amarillos), provocando que el dominio helicoidal (verde) gire alejándose del sitio de enlace del nucleótido guanina y permitiendo el libre intercambio de GDP por GTP. (Según H.R. Bourne, reimpreso con permiso de Nature vol. 366, p. 628, 1993, copyright 1993, Macmillan Magazines Limited.)

LA PERSPECTIVA HUMANA

Trastornos relacionados con receptores acoplados a proteína G

Algunos de los mensajeros químicos más importantes del cuerpo, como epinefrina, hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y las gonadotropinas, hacen sentir su presencia en el cuerpo al enlazarse a receptores que transmiten señales por medio de proteínas G heterotriméricas. Algunos de los componentes en la vía de señalamiento, como el propio receptor, sólo participan en la respuesta a esta hormona particular, en tanto que otros componentes de la cadena, como la adenililciclase, tal vez participen en las respuestas de células a muchos diferentes estímulos extracelulares. Por consiguiente, las mutaciones que afectan gravemente la actividad de las proteínas, como la adenililciclase, sería de esperar que sus efectos se propaguen ampliamente sobre las funciones corporales, efectos que pueden producir la muerte durante el desarrollo embrionario fetal. Por lo contrario, las mutaciones que producen receptores defectuosos causarían trastornos con una gama más estrecha de anomalías.

En los últimos años, algunas enfermedades hereditarias se han atribuido a defectos en receptores de la superficie celular (fig. PH 15-1) o defectos en sus proteínas G (cuadro PH 15-1). La diabetes insípida nefrótica congénita (DINC) es una rara enfermedad hereditaria en la cual los lactantes sufren deshidratación grave como resultado de la incapacidad de sus riñones para producir orina concentrada. Si no se diagnostica oportunamente, la deshidratación crónica puede producir retraso mental, desarrollo inadecuado e incluso la muerte. La enfermedad se debe a la incapacidad de las células del riñón para responder a la hormona vasopresina (hormona antidiurética). Numerosos estudios en lactantes con

esta enfermedad indican que se puede originar a partir de anomalías en los receptores de vasopresina. En la mayor parte de estos casos, el polipéptido es anormalmente corto como resultado de una mutación que introduce un codón para detener la síntesis de polipéptido en el RNAm provocando la terminación prematura de dicha síntesis (pág. 475). Una de las mutaciones estudiadas provoca cambio de un aminoácido situado en la unión entre el tercer segmento transmembrana y la segunda asa intracelular del receptor de siete hélices (sitio 4, fig. PH 15-1). Aunque este receptor todavía puede enlazarse a la vasopresina en la superficie externa, la superficie interna del

receptor es incapaz de activar la proteína G y por lo tanto no puede pasar la señal hacia el efector.

Una mutación que provoca prácticamente el efecto opuesto sobre la interacción entre receptor y proteína G causa un tumor tiroideo benigno llamado adenoma. A diferencia de las células normales de tiroides que secretan hormona tiroidea sólo en respuesta a la estimulación por la hormona hipofisaria TSH, las células de estos adenomas tiroideos secretan grandes cantidades de hormona tiroidea sin ser estimuladas por TSH (se dice que el receptor actúa *constitutivamente*). Los estudios indican que en el receptor de TSH de estas células hay sustitución

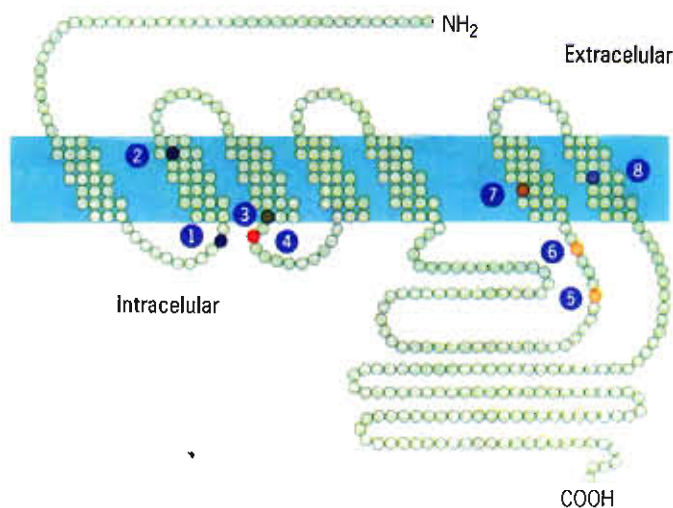


FIGURA PH 15-1. Representación bidimensional de siete receptores transmembrana "compuestos" que muestran los sitios aproximados de varias mutaciones causantes de enfermedades humanas. La mayor parte de las mutaciones (números 1, 2, 5, 6, 7 y 8) dan como resultado la estimulación constitutiva del efector, pero otras (3 y 4) bloquean la capacidad del receptor para estimular el efector. Las mutaciones en los sitios 1 y 2 se observan en el receptor de MSH (hormona estimuladora de melanocitos), sitio 3 en el receptor de ACTH, sitio 4 en el receptor de vasopresina, 5 y 6 en el receptor de TSH (hormona estimuladora de tiroides), 7 en el receptor de LH (hormona luteinizante) y 8 en la rodopsina, el pigmento fotosensible de la retina.

de aminoácidos que afectan la estructura de la tercera asa de la proteína (fig. PH 15-1, mutaciones en el sitio 5 o 6). Como resultado de la mutación, el receptor de TSH activa constitutivamente una proteína G en su superficie interna y envía una señal continua a través de la vía que no sólo provoca secreción excesiva de hormona tiroidea, sino también crecimiento y división excesiva de la célula que causa el tumor. Esta conclusión se comprobó introduciendo el gen mutante en células cultivadas que normalmente carecen de este receptor y demostrando que la síntesis de la proteína mutante y su incorporación a la membrana plasmática conduce a la producción continua de AMPc en células manipuladas genéticamente.

La mutación que provoca los adenomas tiroideos no se observa en la

porción normal de la glándula tiroides del paciente, sino sólo en el sitio tumoral, lo que indica que la mutación no es hereditaria sino que se originó en alguna célula tiroidea, la cual prolifera para dar lugar al tumor. Una mutación en una célula del cuerpo, como una célula tiroidea, se denomina *mutación somática*, para distinguirla de una mutación hereditaria que ocurre en todas las células individuales. Como veremos en el capítulo 16, las mutaciones somáticas son causa primaria de cáncer humano.

En el cuadro PH 15-1 se hace notar que las mutaciones en genes que codifican las subunidades de las proteínas G heterotriméricas también pueden conducir a trastornos hereditarios, como se ilustra en un trabajo recientemente publicado acerca de dos pacientes varones afectados de una combinación rara

de enfermedad endocrina: pubertad precoz e hipoparatiroidismo. Se observó que ambos pacientes tienen una sola sustitución de un aminoácido en una de las isoformas G_{α} . La alteración en la secuencia de aminoácidos causó dos efectos en la proteína G de la cual forman parte. A temperaturas por debajo de la temperatura normal del cuerpo, la proteína G mutante permaneció en estado activo, aun en ausencia de un ligando enlazado. En contraste, a la temperatura normal del cuerpo, la proteína G mutante se mostró inactiva, tanto en presencia como en ausencia de un ligando enlazado. Los testículos, que se encuentran alojados fuera del centro del cuerpo, tienen temperatura menor que los órganos viscerales del cuerpo (33°C en comparación a 37°C). En condiciones normales, las células endocrinas de los testículos inician la producción de testosterona en el momento de la pubertad como respuesta a la hormona hipofisaria LH, que se comienza a producir en ese momento. La LH circulante se enlaza a los receptores LH situados en la superficie de las células testiculares, y desencadena la síntesis de AMPc y la producción subsecuente de la hormona sexual masculina. Las células testiculares del paciente portadoras de la mutación de la proteína G fueron estimuladas para sintetizar AMPc en ausencia del ligando LH, provocando la síntesis prematura de testosterona y pubertad precoz. En contraste, la mutación en la subunidad G_{α} de las células de las glándulas paratiroides, que funcionan a una temperatura de 37°C , inactivó a la proteína G. Como resultado, las células de la glándula paratiroides no respondieron a los estímulos que normalmente causarían la secreción de hormona paratiroidea, lo que condujo a la enfermedad hipoparatiroidismo. El hecho de que la mayor parte de los órganos del cuerpo funcionan de manera normal sugiere que esta subunidad G_{α} particular no es esencial en la actividad de la mayor parte de las otras células.

CUADRO PH 15-1. Enfermedades humanas vinculadas con la vía de la proteína G

Enfermedad	Proteína G defectuosa*
Osteodistrofia hereditaria de Albright y pseudohipoparatiroidismo	G_{sa}
Síndrome de McCune-Albright	G_{sa}
Tumores hipofisarios y tiroideos (oncogen <i>gsp</i>)	G_{sa}
Tumores ováricos adrenocorticales (oncogen <i>gip</i>)	G_{sa}
Pubertad precoz mixta y pseudohipoparatiroidismo	G_{sa}
Enfermedad	Receptor de proteína G defectuoso
Hipercalcemia hipocalciúrica familiar	Receptor humano análogo de BoPCAR1
Hiperparatiroidismo grave neonatal	Receptor humano análogo de BoPCAR1 (homocigoto)
Hipertiroidismo (adenoma tiroideo)	Receptor de tirotropina
Pubertad precoz masculina familiar	Receptor de hormona luteinizante (LH)
Diabetes nefrótica insípida vinculada al cromosoma X	Receptor de vasopresina V2
Retinitis pigmentaria	Receptor de rodopsina
Ceguera a los colores, variaciones en la sensibilidad al espectro de luz	Receptor de opsina fusiforme
Deficiencia familiar de glucocorticoides y deficiencia aislada de glucocorticoides	Receptor de hormona adrenocorticotrópica (ACTH)

* Según se describe en el texto, una proteína G con G_{sa} actúa para estimular el efector, en tanto que una proteína G con una G_{ia} inhibe al efector.

FUENTE: D.E. Clapham, reimpresso con permiso de *Nature*, vol. 371, p. 109, 1994. Copyright 1994 por Macmillan Magazines Limited.

cadenar los síntomas de un ataque de alergia. Ambas respuestas, una que produce secreción y la otra contracción, son desencadenadas por el mismo mensajero celular, una sustancia derivada del compuesto fosfatidilinositol. Recordemos del capítulo 4 que el fosfatidilinositol (PI) es uno de los componentes menores de la membrana celular (fig. 4-22). El fosfatidilinositol no sólo es un componente estructural de la bicapa de lípidos, sino también es precursor de algunas moléculas reguladoras claves cuyas estructuras se muestran en la figura 15-13.

La adición de un solo grupo fosfato al inositol del azúcar de PI genera PI 4-fosfato (PIP), que se puede fosforilar una segunda vez para formar PI 4,5-difosfato (PIP₂) (pasos 1 y 2, fig. 15-13). Cuando la acetilcolina se enlaza a una célula de músculo liso o un antígeno se enlaza a una célula cebada, el receptor enlazado activa una proteína G heterotrimérica (paso 3), que a su vez activa al receptor **fosfolipasa C**, el cual (igual que la adenililciclase) se sitúa en la superficie interna de la membrana (fig. 15-13).² La fosfolipasa C es una enzima que cataliza una reacción para separar PIP₂ en dos moléculas, inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG) (paso 4); ambas reacciones desempeñan papeles importantes como segundos mensajeros en las señales celulares. Examinaremos cada uno de estos segundos mensajeros por separado.

² La fosfolipasa C activada por las proteínas G se identifica como PLC β , para distinguirla de una isoforma llamada PLC γ , activada por un receptor de tirosincinasa (pág. 672). Ambas formas catalizan la misma reacción pero muestran diferentes propiedades.

Diacilglicerol (DAG). El diacilglicerol (fig. 15-13) es una molécula lípida que permanece en la membrana plasmática después de ser sintetizada por fosfolipasa C. Allí activa a un efector, llamado **proteincinasa C** (fig. 15-14), que fosforila residuos de serina y treonina sobre las proteínas específicas. La proteincinasa C es en realidad miembro de una familia de enzimas relacionadas, algunas de las cuales son activadas sólo por segundos mensajeros lípidos, como el DAG, en tanto que otras requieren la presencia simultánea de iones Ca²⁺ (de allí la C en el nombre de la enzima) como coactivador. Igual que la proteincinasa A (la enzima activada por el AMPc), la proteincinasa C es una cinasa multifuncional, y serina y treonina son capaces de fosforilar a una gran variedad de proteínas. La proteincinasa C tiene varios papeles importantes en el crecimiento y diferenciación celular, el metabolismo celular y la activación de transcripción, la mayor parte de las cuales todavía no son bien comprendidas (cuadro 15-4).

En células hepáticas, la proteincinasa C actúa de manera sinérgica con la proteincinasa A; ambas cinasas fosforilan la glucógeno sintasa inhibiendo la actividad de esta enzima polimerizadora de glucosa. En mioblastos, o sea, células embrionarias que darán lugar a células musculares, la activación de la proteincinasa C conduce a la fosforilación de la proteína miogenina, factor de transcripción que desempeña un papel clave en la diferenciación de la célula muscular (fig. 12-41). La fosforilación de miogenina inhibe su capacidad para enlazarse a DNA, y por lo tanto impide la diferenciación de las células en fibras musculares.

La aparente importancia de la proteincinasa C en el control del crecimiento se observa en estudios con un grupo de compuestos potentes de plantas llamados *ésteres de forbol*.

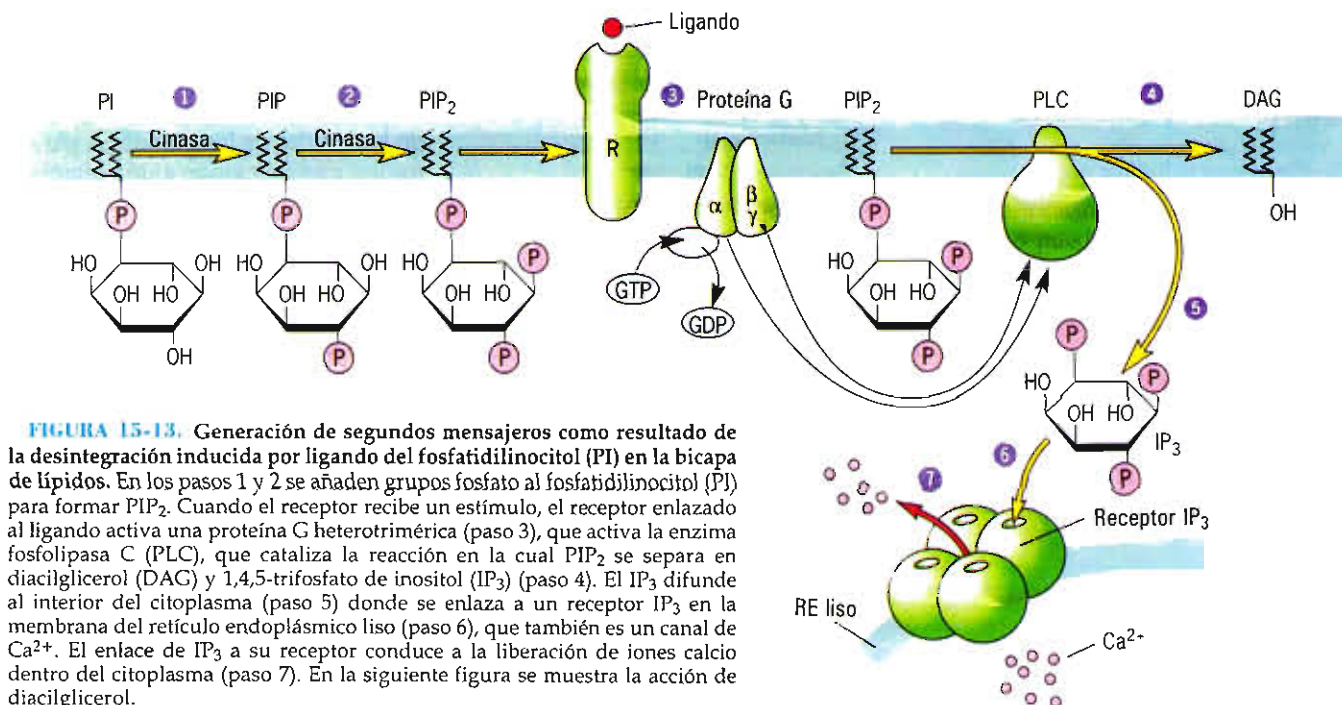


FIGURA 15-13. Generación de segundos mensajeros como resultado de la desintegración inducida por ligando del fosfatidilinositol (PI) en la bicapa de lípidos. En los pasos 1 y 2 se añaden grupos fosfato al fosfatidilinositol (PI) para formar PIP₂. Cuando el receptor recibe un estímulo, el receptor enlazado al ligando activa una proteína G heterotrimérica (paso 3), que activa la enzima fosfolipasa C (PLC), que cataliza la reacción en la cual PIP₂ se separa en diacilglicerol (DAG) y 1,4,5-trifosfato de inositol (IP₃) (paso 4). El IP₃ difunde al interior del citoplasma (paso 5) donde se enlaza a un receptor IP₃ en la membrana del retículo endoplásmico liso (paso 6), que también es un canal de Ca²⁺. El enlace de IP₃ a su receptor conduce a la liberación de iones calcio dentro del citoplasma (paso 7). En la siguiente figura se muestra la acción de diacilglicerol.

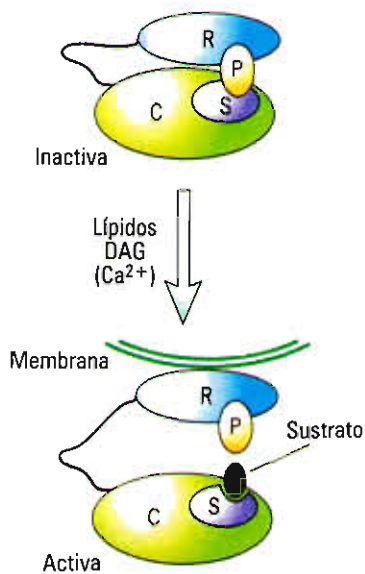


FIGURA 15-14. Modelo de la activación de una proteincinasa C (PKC). En este modelo, la molécula PKC consta de varios dominios, incluyendo un dominio catalítico (C), un dominio regulador (R), una bolsa para enlazar sustrato (S) que constituye el sitio activo, y un motivo pseudosustrato (P) que consta de una parte de la proteína que puede adaptarse sobre el sitio activo. En la parte de arriba se muestra la molécula PKC en el estado inactivo, en el cual P se une a S, impidiendo el acceso al verdadero sustrato. Cuando DAG es activado por lípidos, Ca^{2+} o ambos, la molécula sufre un cambio de conformación (abajo) que permite el acceso al sustrato del sitio activo de la enzima. (Según L.V. Dekker y P.J. Parker, Trends in Biochem. Sci. 19:73, 1994.)

Estos compuestos activan la proteincinasa C en varias células normales cultivadas, lo que provoca pérdida de control del crecimiento y comportamiento transitorio como células malignas. Cuando se elimina el éster de forbol del medio, las células recuperan sus propiedades de crecimiento normal. En contraste, las células manipuladas genéticamente para expresar en forma constitutiva la proteincinasa C mues-

tran un fenotipo maligno permanente en cultivo de células y son capaces de producir tumores en ratones susceptibles.

1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3). El 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) es un azúcar fosfato, una pequeña molécula hidrosoluble capaz de difundir con rapidez. Las moléculas IP_3 formadas en la membrana difunden hacia el interior del citoplasma (paso 5, fig. 15-13) y se enlazan a un receptor IP_3 específico localizado en la superficie del retículo endoplásmico liso (paso 6, fig. 15-13). En la página 281, se hizo notar que el REL es un sitio de almacenamiento de calcio en varias células. Su receptor IP_3 es más que un receptor; también es un canal tetramérico de Ca^{2+} . El enlace de IP_3 abre el canal y permite difundir a los iones Ca^{2+} hacia el citoplasma (paso 7, fig. 15-13). Los iones Ca^{2+} también se pueden considerar como mensajeros celulares, puesto que difunden al citoplasma y se enlazan a diferentes moléculas específicas desencadenando respuestas específicas. En los dos ejemplos mencionados antes, tanto la contracción de una célula de músculo liso como la exocitosis de gránulos secretorios que contienen histamina en una célula cebada son desencadenados por concentración elevada de calcio. Igual es la respuesta de una célula hepática a la hormona vasopresina (la misma hormona con actividad antidiurética en el riñón). La vasopresina se une a su receptor a nivel de la superficie celular y genera una serie de descargas de liberación de Ca^{2+} mediada por IP_3 , que aparecen como oscilaciones de la concentración de calcio libre en el registro mostrado en la figura 15-15. El efecto de IP_3 de ordinario es transitorio debido a su rápida inactivación por medio de enzimas. En el cuadro 15-5 se presenta una lista de algunas respuestas mediadas por IP_3 .

Más acerca del calcio

Los iones calcio desempeñan un papel clave en una notable variedad de actividades celulares importantes, incluyendo división celular, secreción, endocitosis, fertilización, transmisión sináptica, metabolismo y movimiento celular. Se han desarrollado técnicas de imágenes computadorizadas que emplean colorantes fluorescentes que se enlazan a calcio para revelar la concentración de iones libres de calcio en diferentes partes de una célula en distintos momentos. Estas técnicas suministran imágenes espectaculares de los cambios de concentración del calcio citoplásmico libre que ocurre en respuesta a diferentes tipos de estímulo. Dependiendo del tipo de célula, un estímulo particular puede inducir oscilaciones en la concentración de iones libres de calcio, según se muestra en la figura 15-15, producir una onda de liberación de Ca^{2+} que se puede propagar desde un extremo de la célula al otro, o desencadenar liberación transitoria localizada de Ca^{2+} en una parte de la célula. La figura 15-16 muestra el espectacular incremento transitorio de la concentración de iones calcio en ciertas partes de una célula fagocitaria sanguínea cuando se pone en contacto con un objeto en su ambiente y se mueve para engullirlo. El incremento de $[\text{Ca}^{2+}]$ en el fagocito tal vez refleje su papel en la regulación de los cambios en la actividad del citoesqueleto necesarios para la fagocitosis.

Aunque el ion calcio es muy diferente en estructura a un nucleótido cíclico o un fosfato de inositol y no es una sustancia sintetizada enzimáticamente, comparte una propiedad importante con estos otros mensajeros citoplásmi-

CUADRO 15-4. Ejemplos de respuesta mediada por proteincinasa C

Tejido	Respuesta
Plaquetas sanguíneas	Liberación de serotonina
Células cebadas	Liberación de histamina
Médula suprarrenal	Secreción de epinefrina
Páncreas	Secreción de insulina
Células de la hipófisis	Secreción de GH y LH
Tiroides	Secreción de calcitonina
Testículos	Síntesis de testosterona
Neuronas	Liberación de dopamina
Músculo liso	Incremento de la contractilidad
Hígado	Hidrólisis de glucógeno
Tejido adiposo	Síntesis de grasa

FUENTE: U. Kikkawa y Y. Nishizuka, reproducido con permiso de *Annual Review of Cell Biology*, vol. 2, © 1986 por Annual Reviews Inc.

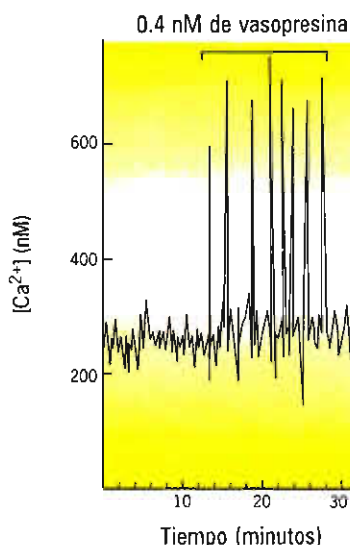


FIGURA 15-15. Demostración experimental de cambios en la concentración de calcio libre en respuesta a la estimulación hormonal. A una célula hepática se le inyectó aecuatorina, proteína extraída de ciertas medusas que muestran luminiscencia cuando se enlazan a iones calcio. La intensidad de la luminiscencia es proporcional a la concentración de iones calcio libres. La exposición de la célula a vasopresina provoca varias ondas de calcio libre a intervalos periódicos. Esta respuesta se obtuvo en una célula expuesta a 0.4 nM de vasopresina, que se encuentra en el extremo inferior del límite fisiológico. Esta célula previamente se había expuesto a 0.2 nM de vasopresina y no hubo respuesta. (Según N.M. Woods, K.S. Cuthbertson y P.H. Cobbold. Reimpreso con permiso de Nature, vol. 366, p. 628, 1986. Copyright 1986, Macmillan Magazines Limited.)

cos; a saber, su concentración en el citoplasma es determinada por acontecimientos que ocurren dentro de una membrana. En circunstancias normales, la concentración de Ca²⁺ se mantiene a niveles muy bajos dentro del citoplasma, típicamente alrededor de 10⁻⁷ M. En contraste, la concentración de este ion en el espacio extracelular o entre ciertos organelos citoplásmicos, como el REL o las mitocondrias, puede ser

CUADRO 15-5. Resumen de respuestas celulares producidas por adición de IP₃ a células permeabilizadas o íntegras

Tipo de célula	Respuesta
Músculo liso vascular	Contracción
Músculo liso del estómago	Contracción
Músculo esquelético	Contracción
Moho del fango	Formación de GMP cíclico, polimerización de actina
Plaquetas sanguíneas	Cambio de forma, agregación
Bastoncillos de salamandra	Modulación de la respuesta a la luz
Oocitos de <i>Xenopus</i>	Movilización de calcio, despolarización de la membrana
Huevos de erizo de mar	Despolarización de la membrana, reacción cortical
Glándula lagrimal	Incremento de la corriente de potasio

Adaptado de M.J. Berridge, reproducido con permiso de *Annual Review of Biochemistry*, vol. 56, © 1987 por Annual Reviews Inc.

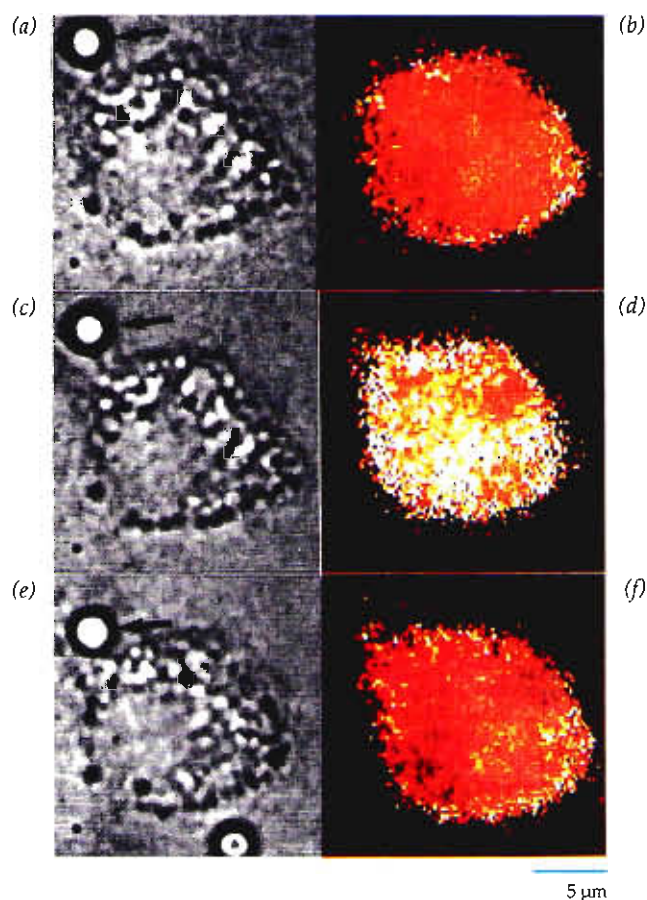


FIGURA 15-16. Demostración experimental de los cambios transitorios en la concentración de calcio intracelular en un macrófago durante la fagocitosis de una sola esferilla recubierta de IgG. Los macrófagos fueron cargados previamente con un colorante fluorescente sensible a calcio y luego incubados con las esferillas recubiertas de IgG. a) Se muestra un macrófago en una imagen de campo brillante luego de enlazarse a una sola esferilla, y b) la correspondiente imagen con fluorescencia revela la [Ca²⁺] en diferentes regiones de la célula. Luego de 66.6 segundos, la esferilla enlazada permanece en el mismo sitio y el mismo foco (c), pero la [Ca²⁺] se eleva hasta un valor máximo (d); la [Ca²⁺] retorna posteriormente a un nivel cercano a la basal (f) y las esferillas se mueven al interior de las células. La flecha indica el sitio de la esferilla. (Según Takashi Hishikawa y cols. J. Cell Biol. 115:62, 1991; con permiso de Rockefeller University Press.)

más de 10 000 veces mayor. La concentración citoplásmica de calcio se mantiene muy baja debido a la relativa impermeabilidad de las membranas a este ion y gracias a la presencia en la membrana plasmática y las membranas celulares de un sistema de transporte que bombea calcio hacia afuera del citoplasma. Muchos estímulos diferentes, que van desde un espermatozoide fertilizante hasta un impulso nervioso que llega a la célula muscular, inducen su respuesta en una célula específica, lo que provoca un incremento súbito de la concentración de Ca²⁺ en el citoplasma. En el cuadro 15-6 se muestran algunos objetivos específicos del [Ca²⁺] elevado. Algunas de las respuestas inducidas por calcio son mediadas por el segundo mensajero IP₃, pero se conocen diversos factores que abren transitoriamente los canales de calcio en el REL o en la membrana plasmática.

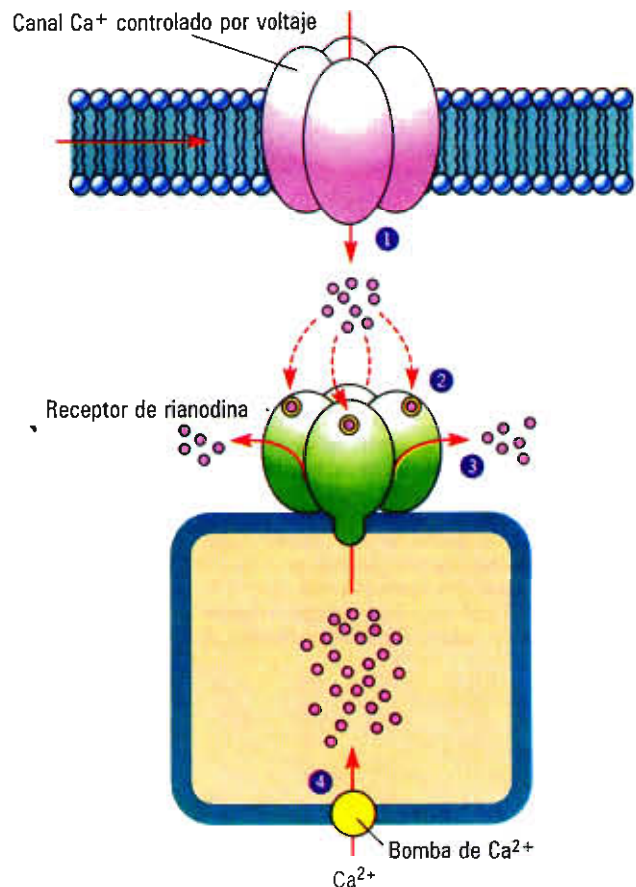
CUADRO 15-6. Ejemplos de proteínas de mamífero desencadenadas por Ca^{2+}

Proteína	Función de la proteína
Troponina C	Modulador de la contracción muscular
Calmodulina	Modulador ubicuo de proteincinasas y otras enzimas (MLCK, CaM cinasa II, adenilciclase I)
Calretinina, retinina, vicinina	Activador de guanilciclase
Calcineurina B	Fosfatasa
Calpain	Proteasa
PLC específica de inositol fosfolípido	Generador de IP_3 y diacilglicerol
α -Actinina	Proteína formadora de haces de actina
Anexina	¿Implicada en endocitosis y exocitosis, inhibición de PLA_2 ; canal iónico?
Fosfolipasa A_2	Productor de ácido araquidónico
Proteincinasa C	Proteincinasa ubicua
Gelsolina	Proteína seccionadora de actina
Receptor IP_3	Efectores de liberación de Ca^{2+} intracelular
Receptor de rianodina	Efectores de liberación de Ca^{2+} intracelular
Intercambiador de $\text{Na}^+\text{Ca}^{2+}$	Efectores del intercambio de Ca^{2+} para Na^+ a través de la membrana plasmática
Ca^{2+} ATPasa	Bombeo de Ca^{2+} a través de las membranas
Antiportadores de Ca^{2+}	Intercambiador de Ca^{2+} para iones monovalentes
Caldesmon	Regulador de la contracción muscular
Vilina	Organizador de actina
Arrestina	Finalizador de la respuesta fotorreceptora
Calsecuestrina	Amortiguador Ca^{2+}

Adaptado de D.E. Clapham, *Cell* 80:260, 1995, con permiso de Cell Press.

Los receptores IP_3 pertenecen a uno de dos tipos principales de canales intracelulares para Ca^{2+} ; a los otros se les denomina *receptores de rianodina* porque son sensibles al alcaloide vegetal rianodina. Los receptores de rianodina se observan principalmente en células excitables y son mejor estudiados en células de músculo esquelético, donde se encargan de la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico luego de la llegada de un potencial de acción a lo largo del túbulo T (pág. 365). Según el tipo de célula, una variedad de agentes puede abrir los receptores de rianodina, pero al parecer no por IP_3 . Entre los agentes que pueden abrir los canales de Ca^{2+} de rianodina se encuentra el propio calcio. El flujo hacia adentro de una cantidad limitada de calcio a través de los canales en la membrana plasmática induce la apertura de los receptores de rianodina en el REL, lo que provoca la liberación de Ca^{2+} hacia el citoplasma (fig. 15-17). Este fenómeno, denominado *liberación de calcio inducida por calcio*, puede generar con rapidez una onda transitoria de iones calcio que se propaga a través del citoplasma.

FIGURA 15-17. Liberación de calcio inducida por calcio, la cual ocurre en células excitables como las del músculo cardíaco. Un cambio del voltaje de la membrana provoca la apertura de los canales de calcio gobernados por voltaje en la membrana plasmática, lo que permite la entrada de una pequeña cantidad de Ca^{2+} (paso 1). Los iones calcio se enlazan al receptor de rianodina en la membrana del REL (paso 2), provocando la liberación del calcio almacenado (paso 3). A continuación los iones calcio se liberan del citoplasma por acción de una bomba de Ca^{2+} localizada en la membrana del REL (paso 4). (Según M.J. Berridge, *reimpreso con permiso de Nature*, vol. 361, p. 317, 1993. Copyright 1993, Macmillan Magazines Limited.)



La elevación de la concentración del ion calcio es transitoria porque los iones rápidamente son bombeados hacia afuera del citoplasma y regresan al REL o al exterior de la célula en el espacio extracelular.

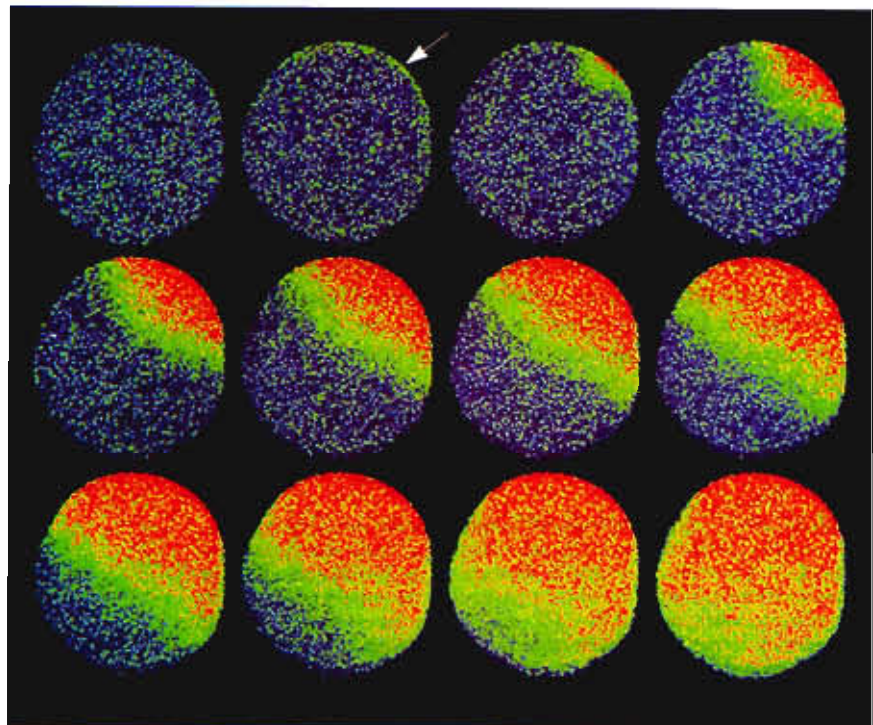
Una de las ondas más espectaculares de Ca^{2+} ocurre antes del primer minuto, aproximadamente, después de la fertilización y es indicada por el contacto del espermatozoide con la membrana plasmática del óvulo (fig. 15-18). La súbita elevación de la concentración de calcio en el citoplasma es un importante factor desencadenante para iniciar procesos del desarrollo embrionario temprano, incluyendo activación de cinasas dependiente de ciclinas (pág. 583) que impulsan al huevo fertilizado hacia su primera división mitótica. Se cree que esta onda de calcio se inicia por la síntesis en la superficie interna de la membrana celular de un segundo mensajero denominado ADPRc (ribosa de difosfato de adenosina cíclica, figura 15-19, a). Las moléculas ADPRc se difunden al citoplasma donde provocan la abertura de los canales de Ca^{2+} receptores de rianodina en la membrana del retículo endoplásmico liso. La inyección de cantidades muy pequeñas de ADPRc a un huevo no fertilizado de erizo de mar puede desencadenar la liberación de Ca^{2+} de los almacenes de la membrana (fig. 15-19, b) con activación completa del óvulo. Se ha considerado al ADPRc como un segundo mensajero que abre los canales de Ca^{2+} de rianodina en una gran variedad de células, incluyendo células beta pancreáticas, donde produce secreción de la hormona insulina en respuesta a la elevación de la concentración de glucosa en sangre.

A diferencia de los nucleótidos cíclicos, cuya acción invariablemente es mediada por estimulación de una pro-

teína, el calcio puede afectar a diversos tipos de efectores celulares, entre ellos a proteincinasas dependientes de calcio. Según la célula, la concentración elevada de calcio puede producir activación o inhibición de varias enzimas y sistemas de transporte, cambios en la permeabilidad iónica de membranas, fusión de membranas y alteraciones en la función contráctil del citoesqueleto. En estado iónico libre, el calcio de ordinario no actúa sobre estos diferentes efectores, sino que se enlaza a un pequeño número de **proteínas que se enlazan a calcio**, que a su vez despiertan la respuesta celular. Sólo una de estas proteínas que se enlazan a calcio está extensamente distribuida; es la **calmodulina**, un pequeño polipéptido descubierto en tejido cerebral a finales de los años 1960.

Cada molécula de calmodulina (fig. 15-20, a) contiene cuatro sitios de enlace para calcio; el enlace de uno o más iones Ca^{2+} modifica la conformación de la proteína incrementando su afinidad por muchas otras proteínas. Según la célula, el complejo calcio-calmodulina puede unirse a una proteincinasa, una nucleótido fosfodiesterasa cíclica, o incluso al sistema de transporte de calcio de la membrana plasmática. En este último caso, la concentración elevada de calcio activa al sistema encargado de desembarazar a la célula de cantidades excesivas de este ion, constituyendo así un mecanismo autorregulador para conservar baja la concentración de calcio intracelular. La calmodulina se encuentra en todas las plantas, animales y microorganismos eucariotas, y prácticamente tiene la misma secuencia de aminoácidos en toda la gama de eucariotes. En la figura 15-20, b, se muestra la distribución de calmodulina en el ojo compuesto de la mosca de la fruta.

FIGURA 15-18. Onda de calcio en el óvulo de una estrella de mar inducida por un espermatozoide fertilizante. Se inyectó un colorante fluorescente sensible a calcio en el óvulo no fertilizado y en el óvulo fertilizado, y se tomaron fotografías cada cinco segundos con un microscopio confocal. La liberación de Ca^{2+} se propaga desde el punto de entrada del espermatozoide (flecha) a través de todo el óvulo. El color azul indica concentración baja $[\text{Ca}^{2+}]$ libre, en tanto que el color rojo indica concentración elevada de calcio. (Cortesía de Stephen A. Stricker.)



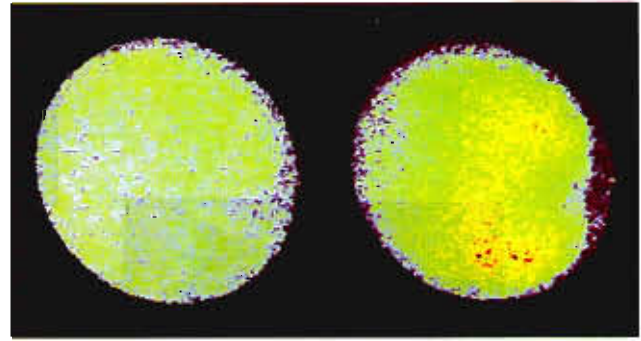
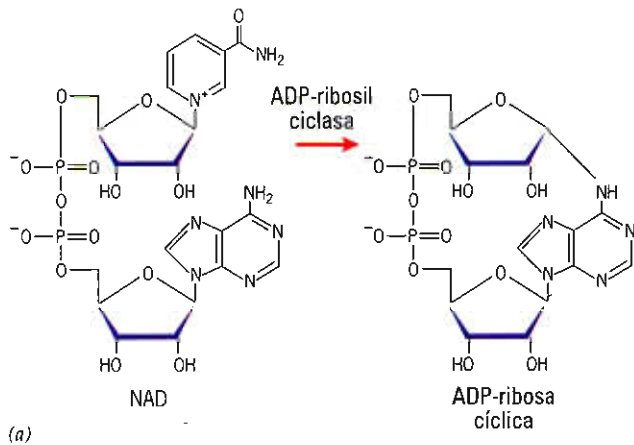
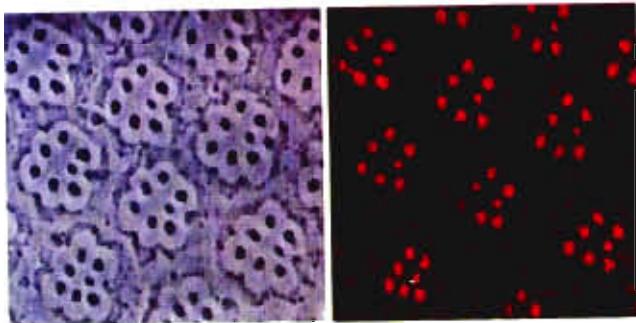
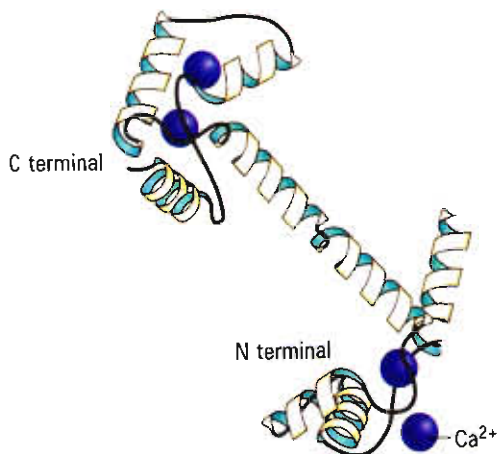


FIGURA 15-19. La ADP-ribose cíclica tal vez sea un segundo mensajero para despertar la respuesta de fertilización. *a)* Formación de ADPRc a partir de NAD⁺. *b)* Este huevo de erizo de mar fue cargado previamente con colorante sensible a calcio y luego se le aplicó una microinyección de una solución de ADPRc. El cambio de color dentro del huevo refleja elevación de la concentración de calcio intracelular desde 100 nM (azul y verde) hasta 900 nM (rojo y amarillo) luego de la inyección. (*b*: Reimpreso con permiso de Antony Galione, *Science* 259:325, 1993; copyright 1993 American Association for the Advancement of Science.)

Regulación de la concentración de calcio en células vegetales

Se cree que los iones calcio (que actúan junto con la calmodulina) son segundos mensajeros importantes para desen-



cadenar respuestas en células vegetales. La concentración de calcio citoplásmico cambia de manera espectacular en ciertas células vegetales en respuesta a varios estímulos, incluyendo cambios de la iluminación, presión, gravedad y la concentración de hormonas de la planta, como el ácido abscísico. La concentración de Ca²⁺ en el citoplasma es regulada por la permeabilidad de los canales de Ca²⁺ localizados en la membrana plasmática y también por la disponibilidad del Ca²⁺ almacenado en la vacuola. Se cree que la membrana (tonoplasto) que rodea la vacuola posee canales de Ca²⁺ que, igual que en las células animales, son abiertos por moléculas de trifosfato de inositol (IP₃) producidas por una fosfolipasa C enlazada a la membrana plasmática.

El papel de la concentración cambiante de Ca²⁺ citoplásmico se puede observar más claramente en las células de defensa, cuya función es regular el diámetro de los poros microscópicos (estomas) a través de los cuales el CO₂ atmosférico alcanza las células de las hojas que contienen cloroplastos (fig. 15-21, *a*). Como se analiza en la página 228, los estomas son la vía principal para perder agua, y se debe controlar su diámetro de apertura para evitar la desecación.

FIGURA 15-20. Calmodulina. *a)* Diagrama de la calmodulina en forma de listón con cuatro iones calcio enlazados. *b)* El ojo compuesto de *Drosophila* consta de cientos de fotounidades individuales llamadas ommatidia. Cada ommatidia contiene ocho células fotorreceptoras. Seis de las ocho células fotorreceptoras se extienden a toda la profundidad de la ommatidia, en tanto que las otras dos ocupan las porciones superior o inferior de una ommatidia; por consiguiente, sólo siete células fotorreceptoras están presentes en cualquier sección transversal determinada (izquierda). La distribución espacial de la proteína calmodulina enlazada a calcio es revelada por inmunofluorescencia (derecha) y se observa que ocupa una parte de cada uno de los fotorreceptores. (*b*: Reimpreso con permiso de Jeffrey A. Porter y cols., cortesía de Craig Montell, *Science* 262:1039, 1993; copyright 1993 American Association for the Advancement of Science.)

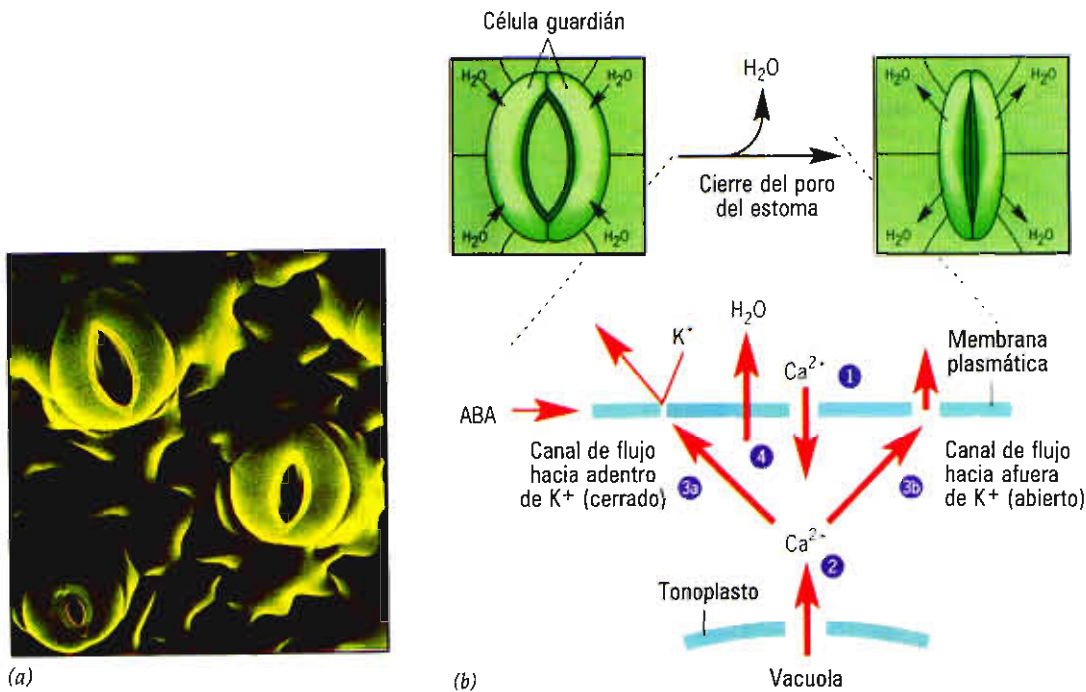


FIGURA 15-21. Papel del calcio como segundo mensajero en el cierre de las células guardianes. *a)* Fotografía de los poros estomáticos, cada uno flanqueado por un par de células guardianes. Los estomas se conservan abiertos en tanto la presión por turgencia se mantenga elevada entre las células guardianes, provocando que sobresalgan hacia afuera, como se observa aquí. *b)* Uno de los factores que controla el tamaño del poro de los estomas es la hormona ácido abscísico (ABA). Cuando la concentración de ABA se eleva, los canales de ion calcio en la membrana plasmática se abren, permitiendo el ingreso de Ca^{2+} (paso 1), que desencadena la liberación de Ca^{2+} de los almacenes internos (paso 2). La subsecuente elevación de $[Ca^{2+}]$ intracelular provoca el cierre de los canales de flujo hacia adentro de K^+ (paso 3a) y la apertura de los canales de flujo hacia afuera de K^+ (paso 3b), lo que conduce a un descenso de la concentración interna del soluto y la pérdida de agua por ósmosis (paso 4). (*a:* Jeremy Burgess/Photo Researchers.)

Condiciones adversas, como temperaturas altas y escasa humedad, estimulan la liberación de ácido abscísico, que actúa sobre las células protectoras para incrementar la permeabilidad de los canales de calcio en la membrana plasmática (fig. 15-21, *b*). El flujo hacia adentro de Ca^{2+} desencadena la liberación de Ca^{2+} adicional procedente de los almacenes intracelulares que actúan para cerrar los canales de ingreso de K^+ en la membrana plasmática, en tanto que abre los canales de salida de K^+ . Estos cambios inducen flujo neto hacia afuera de iones potasio y disminución de la presión de líquido (turgencia) dentro de la célula, lo que a su vez disminuye la apertura de los estomas.

15-3 Receptor de tirosincinasas (RTK): un segundo tipo principal de sistemas de señales

Iniciamos el análisis de la transducción de señales con el mecanismo de acción de glucagon y epinefrina, dos hormonas que actúan para poner la glucosa a disponibilidad de los tejidos. La hormona insulina actúa sobre células hepáticas y musculares para iniciar una serie de reacciones opuestas en

las cuales la glucosa se elimina del torrente sanguíneo y se polimeriza para formar glucógeno. Además de sus efectos sobre la captación y metabolismo de la glucosa, la insulina también es un potente estimulante de la síntesis de lípidos (en las células adiposas), síntesis de proteínas, así como del crecimiento y proliferación de las células. El mecanismo mediante el cual la insulina estimula estas diferentes respuestas ha eludido los esfuerzos de los investigadores durante muchos años. Pero en el último decenio se hicieron grandes avances para aclarar el mecanismo mediante el cual interactúa la insulina con la superficie externa de células específicas e indica su presencia a varios efectores dentro de la célula. La insulina actúa por medio de una vía de señales diferente en muchos aspectos de la empleada por glucagon y epinefrina.

Mecanismo de acción de la insulina: señales por un RTK

Las células capaces de responder a la insulina poseen un receptor para insulina en su superficie. El receptor para insulina es algo más que una simple proteína que se enlaza a un ligando; también es una enzima: una **proteincinasa de**

tirosina, enzima que añade el grupo fosfato a residuos de tirosina específicos de otras proteínas. La tirosincinasa forma parte de una superfamilia distinta de la cinasas de serina y treonina que operan en la reacción en cascada analizada anteriormente en relación con la movilización de glucosa (fig. 15-6), aunque un pequeño número de tirosincinasas poseen una doble especificidad y también son capaces de fosforilar residuos de serina y treonina (un ejemplo es la PAMKK de la figura 15-27). Las tirosincinasas participan principalmente en el control del crecimiento y la diferenciación celular, más bien que en el control del metabolismo intermediario. Puesto que el receptor para insulina tiene esta actividad enzimática, se le conoce como **receptor de tirosincinasa** (o **RTK**). Se han identificado más de 50 diferentes RTK y su número aumenta con rapidez. A diferencia de los receptores acoplados a proteína G, que tienen siete segmentos transmembrana, cada monómero de RTK atraviesa la membrana una sola vez.

El receptor de insulina es una proteína tetramérica compuesta de dos cadenas de polipéptido α y dos cadenas de polipéptido β . Las cadenas α residen en la superficie extracelular de la membrana y contienen los sitios para enlazar insulina, en tanto que las cadenas β atraviesan la membrana y transmiten la señal a través de la misma hasta su superficie interna (fig. 15-22). En ausencia de insulina enlazada, la función de la tirosincinasa del receptor es inactiva. El enlace de insulina cambia la conformación del receptor activando su tirosincinasa, la cual entonces añade fosfatos a: 1) residuos específicos de tirosina de la otra subunidad β del complejo, reacción llamada *autofosforilación*, y 2) una docena o más de residuos de tirosina localizados estratégicamente en cuando menos dos sustratos de proteína llamados **sustratos receptores de insulina (SRI)** (fig. 15-22). Al parecer, los SRI fosforilados sólo tienen una función, que es la de enlazar y activar a varios efectores "subsecuentes". Para comprender cómo ocurre esto se necesita un paréntesis en este momento.

El receptor de tirosincinasa no fosforila toda la tirosina en una proteína del sustrato; sólo fosforila a las que están presentes en cierta secuencia de aminoácidos conocidas como "motivos de fosfotirosina". Estudios recientes han revelado que varias proteínas implicadas en las señales celulares contienen dominios, llamados **dominios SH2**, con sitios de elevada afinidad para enlazarse a "motivos de fosfotirosina" (fig. 15-23).³ Los dominios SH2 presentan afinidad escasa o ausente para proteínas cuyos residuos de tirosina no estén fosforilados. Sólo después que una SRI ha sido fosforilada por el receptor de insulina puede actuar como "imán" para enlazar proteínas que posean dominios SH2 con estructura apropiada. El enlace a un motivo de fosfotirosina puede tener efectos diferentes, dependiendo de la proteína particular que contenga el SH2. La interacción puede poner en marcha una actividad enzimática de la proteína, cambiar la conformación de la misma provocando su enlace a otras proteínas, o causar la translocación de la proteína a una parte diferente de la célula.

³ Dominio SH2 es un acrónimo de dominio Src de homología, lo que denota que este dominio que se enlaza a fosfotirosina fue identificado por primera vez en la proteína codificada por el oncogen *src*.

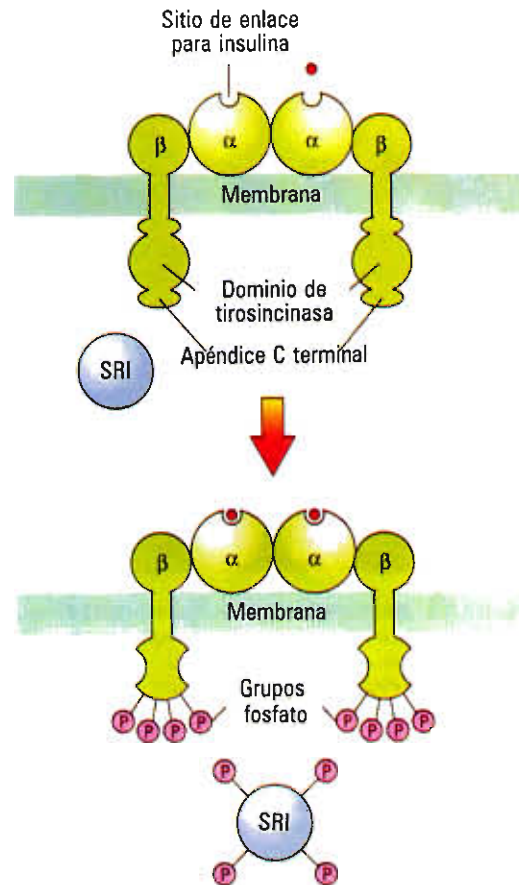


FIGURA 15-22. Respuesta del receptor de insulina para enlace de un ligando. El receptor de insulina es un tetrámero que consta de dos subunidades α y dos β . Cuando la insulina se enlaza a la subunidad α se produce un cambio de conformación en las subunidades β , que activa la acción de tirosincinasas de las subunidades β , lo que a su vez cataliza la transferencia de grupos fosfato hacia residuos de tirosina localizados en el dominio citoplásmico del receptor y también a varios sustratos del receptor de insulina (SRI).

Aunque operan por mecanismos diferentes, hay gran paralelismo entre la proteína G y las vías de señalamiento del receptor de tirosincinasa. En las vías de la proteína G, los cambios de conformación de una proteína G constituyen el interruptor molecular que transmite la señal al interior de la célula, en tanto que en la vía del RTK, la fosforilación de la tirosina ejecuta una función similar. Las proteínas con dominios SH2 se pueden considerar los efectores de RTK, así como la adenililciclase o la fosfolipasa C son efectores para los receptores acoplados a proteína G. Puesto que diferentes células pueden contener distintos efectores con dominios SH2 similares, el mismo ligando puede desencadenar respuestas muy diferentes en diversas células específicas.

Retornemos a la respuesta de insulina. Una vez activado el receptor de insulina, las proteínas SRI fosforiladas sirven como "atracaeros" para numerosas proteínas con dominios SH2, cada una de las cuales puede activar una vía separada para transmisión de señales (fig. 15-24). Como resultado, el mensaje de que se ha enlazado insulina a la

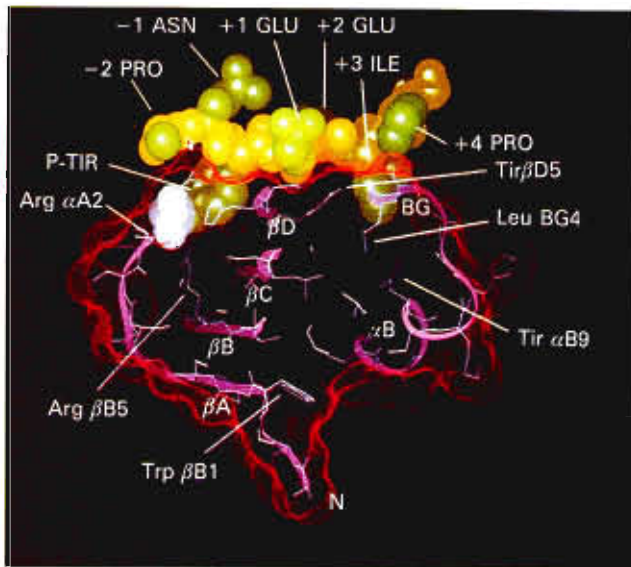


FIGURA 15-23. Interacción entre un dominio SH2 de una proteína y un péptido que contiene un residuo de fosfotirosina. Se muestra el dominio SH2 de un corte con la superficie accesible representada por puntos rojos y el esqueleto del polipéptido como un listón de color púrpura. El heptapéptido que contiene fosfotirosina (Pro-Asn-pTir-Glu-Glu-Ile-Pro) se muestra como un modelo de espacio lleno cuyas cadenas laterales se presentan en color verde y el esqueleto en color amarillo. El grupo fosfato se muestra en color blanco. El residuo de tirosina fosforilado y el residuo de isoleucina (+3) se proyectan dentro de bolsas sobre la superficie del dominio SH2, creando una interacción firmemente adaptada, pero sólo cuando el residuo de tirosina clave está fosforilado. (Según Gabriel Waksman y cols., cortesía de John Kuriyan, Cell 72:783, 1993; con permiso de Cell Press.)

superficie de la célula puede propagarse hasta el interior celular a lo largo de varias vías independientes. Así, una vía puede estimular la síntesis de DNA y la división celular, otra el movimiento de transportadores de glucosa hacia la membrana celular donde pueden introducir moléculas adicionales de glucosa (pág. 147), otra puede activar factores de transcripción encargados de expresar un conjunto de genes específicos de insulina, y aun otra vía más puede conducir a la activación de la síntesis de proteínas (pág. 651).

Uno de los efectores mejor estudiados con un dominio SH2 que se sabe se enlaza a SRI fosforilado es la enzima **fosfatidilinositol 3-hidroxikinasa** [o **PI(3)K**]. La PI(3)K cataliza una reacción en la cual se añade un grupo fosfato a la posición 3' del anillo de azúcar del fosfatidilinositol (PI). Los productos de la enzima, que incluyen 3,4-difosfato PI y 3,4,5-trifosfato PI (fig. 15-24), sirven como precursores para algunos mensajeros celulares que contienen inositol con diversas funciones en las células. De mayor importancia es que la concentración de estos PI fosforilados se relaciona estrechamente con los cambios en el estado de crecimiento de las células específicas, y se ha demostrado que son parte de la vía mediante la cual la insulina puede estimular el crecimiento y la proliferación celulares. En la siguiente sección hablaremos aún más de las vías para estimular el crecimiento.

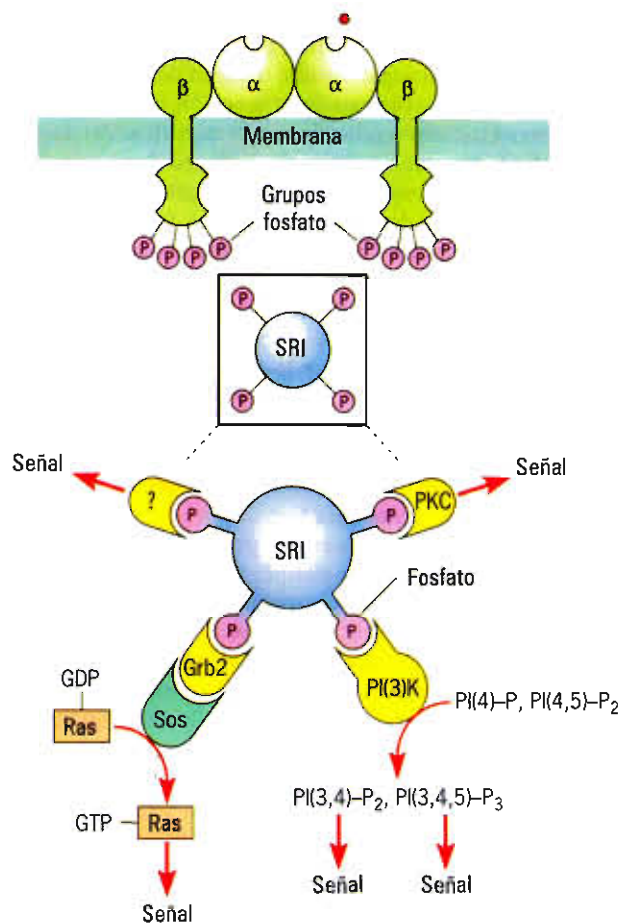


FIGURA 15-24. Papel de los SRI fosforilados de tirosina para activar varias vías de emisión de señales. Se sabe que la fosforilación de SRI por el receptor activado de insulina activa las vías PI(3)K, proteína cinasa C y Ras, todas analizadas en el capítulo. Otras vías menos bien definidas también son activadas por sustratos receptores de insulina.

Papel del RTK en otras actividades celulares

Una gran variedad de agentes extracelulares interactúan como con los RTK sobre la superficie de células específicas y regulan diversas funciones, incluyendo crecimiento y proliferación celulares, curso de la diferenciación celular, captación de partículas extrañas por fagocitosis, y supervivencia de la célula. Entre estos agentes, los mejor estudiados son hormonas como la insulina y la hormona del crecimiento; factores de crecimiento de origen sanguíneo, como el factor de crecimiento epidérmico (FCE), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FCF); y las *citocinas*, que son agentes secretados por un tipo de célula inmunológica que induce una respuesta en otro tipo de célula inmunológica, incluyendo, por ejemplo, interferones (INF) e interleucinas (IL). Todos estos agentes actúan por vías para transducción de señales que se inician con la activación de un receptor de tirosinasa.

A diferencia del receptor de insulina descrito antes, la mayor parte de los RTK se presentan como monómeros en una célula no estimulada. Sólo después que un ligando se une al RTK, los monómeros interactúan entre sí para formar dímeros (fig. 15-25). La dimerización de los polipéptidos RTK activa su función de tirosincinasa y entonces una subunidad del dímero fosforila algunos residuos de tirosina situados en el dominio citoplásmico de la otra subunidad del dímero. La fosforilación de grupos RTK pone en movimiento una cadena de reacciones que recuerda la reac-

ción en cascada descrita en relación con la respuesta de una célula hepática al enlace de glucagon o de epinefrina. Un elemento clave de muchas reacciones RTK en cascada es la proteína Ras.

Importancia de la proteína Ras

La proteína Ras se descubrió originalmente como un oncogen viral, o sea, un gen presente en ciertos virus tumorales que es capaz de malignizar células normales. Investigaciones subsiguientes demostraron que, igual que otros oncogenes, *ras* siempre está presente como parte del genoma normal de animales y del hombre. A principios del decenio de 1980 se observó que el DNA extraído de varios tumores humanos contenía una versión mutante de *ras*. Cuando se introdujo en ciertas células cultivadas, se notó que esta versión mutada del gen *ras* transforma las células en células tumorales malignas, lo que sugiere que las alteraciones en este gen causan en la célula la pérdida de control del crecimiento normal. Estudios subsiguientes han demostrado que una versión alterada del gen *ras* se encuentra en 30 a 40% de todos los tumores humanos. Dada la importancia de este gen en el desarrollo del cáncer humano, gran número de investigadores han enfocado su atención a dilucidar el mecanismo de operación del producto del gen *ras*, y sólo en los últimos años se ha logrado este objetivo.

Ras es una pequeña proteína G monómera que reside en la superficie interna de la membrana plasmática, donde desempeña un papel clave en varias vías internas para transmisión de señales. Igual que otras proteínas G, Ras muestra ciclos entre una forma inactiva enlazada a GDP y una forma activa enlazada a GTP. En su forma activa Ras estimula efectores situados hacia adelante en la vía de transmisión de señales. Como otras proteínas G, Ras tiene actividad GTPasa intrínseca que hidroliza la GTP enlazada para formar GDP enlazada, actuado así como interruptor que desactiva la proteína.⁴ Las mutaciones en el gen *ras* que conducen a la formación del tumor generalmente son aquellas que evitan que la proteína hidrolice la GTP enlazada para retornar a la forma GDP. Como resultado, la versión mutante de Ras permanece en la posición "activada", enviando un mensaje continuo hacia adelante a lo largo de la vía de transmisión de señales que mantienen a la célula en la modalidad proliferativa. Se han descubierto otras versiones mutantes de Ras que previenen el enlace de GTP y por lo tanto impiden la división celular.

Se cree que Ras participa en varias vías diferentes para transmisión de señales, actuando quizá como uno de los puntos focales a partir del cual irradian varias vías (fig. 15-31). En su papel mejor estudiado, Ras es un elemento clave dentro de una vía que se extiende a través de la célula desde la superficie externa de la membrana plasmática hasta el material genético que reside en el núcleo. Los hechos se

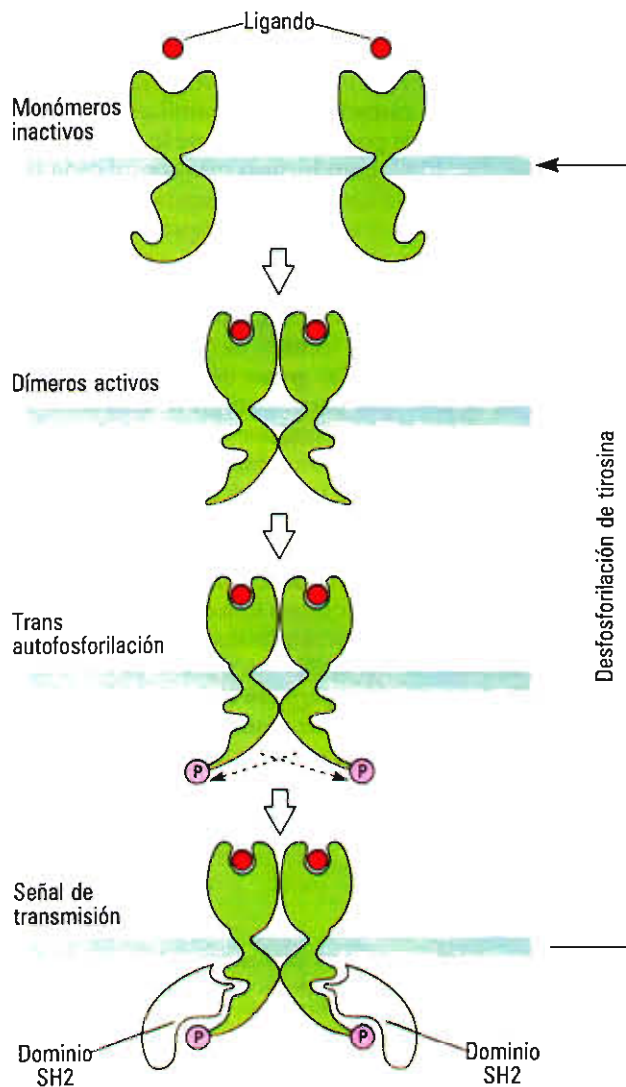


FIGURA 15-25. Pasos en la activación generalizada de un receptor de tirosincinasa (RTK). En el estado no activado los receptores están presentes en la membrana como monómeros. El enlace del ligando conduce a la dimerización del receptor y activación de su actividad cinasa, añadiendo grupos fosfato al dominio citoplásmico del receptor. Los residuos de fosfotirosina recién formados del receptor sirven como sitios de enlace para proteínas específicas que contienen dominios SH2, activados como consecuencia de su interacción con el receptor. (Según J. Schlessinger y A. Ulrich, *Neuron* 9:384, 1992, con permiso de Cell Press.)

⁴ La actividad GTPasa intrínseca de Ras es relativamente débil comparada con la de la subunidad α de las proteínas G heterotriméricas analizadas anteriormente. En la célula, la actividad GTPasa de Ras es estimulada por algunas proteínas activadoras de GTPasa (PAG), que desempeñan un papel importante para concluir la respuesta.

inician con el enlace de varios factores de crecimiento, como FCE o FCDP, al dominio extracelular de su respectivo receptor (como en la figura 15-25).

La cascada de proteincinasa activada por mitógeno

En las figuras 15-26 y 15-27 se muestra la secuencia de sucesos que ocurren en la vía Ras para transmitir señales luego del enlace del factor de crecimiento al receptor de tirosincinasa.

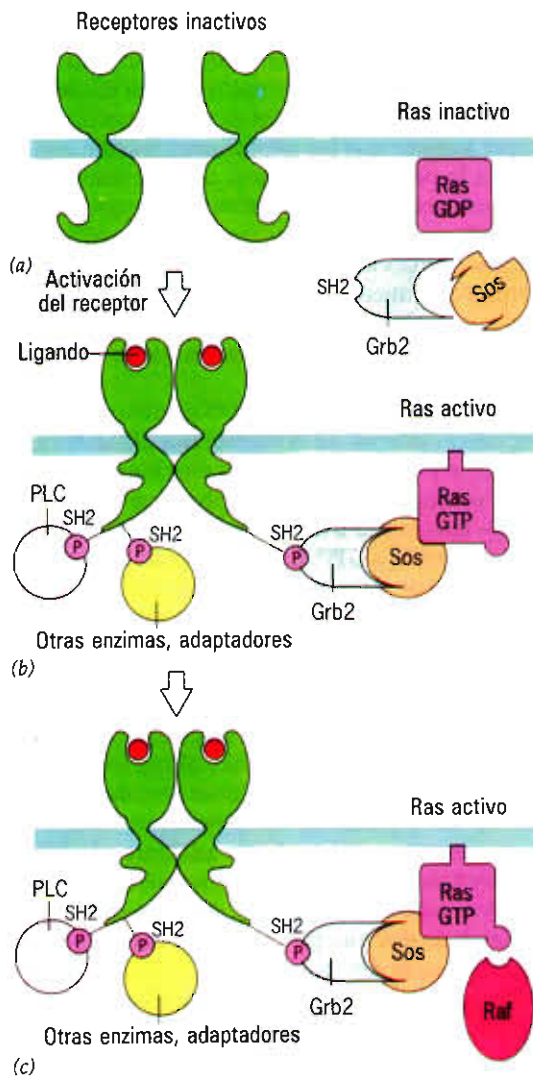


FIGURA 15-26. Etapas en la activación de Ras por RTK. Algunos receptores diferentes, incluyendo los que se enlazan al factor de crecimiento epidérmico (FCE) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), actúan como se indica en esta figura. *a*) En el estado inactivo, los receptores se presentan como monómeros y Ras se combina con GDP, y por lo tanto es inactivo. *b*) El enlace de un ligando desencadena la dimerización del receptor, lo que conduce a la autofosforilación de los dominios citoplásmicos del dímero receptor. Los residuos de fosfotirosina recién formados actúan como sitios para el enlace de Grb2-Sos, que inducen la sustitución de GTP por GDP sobre Ras. *c*) El Gtp-Ras activado actúa como sitio de enlace para Raf, localizando así a esta proteína en la membrana plasmática donde desencadena la cascada cPAM detallada en la siguiente figura.

En breve, las fosfotirosinas generadas en el dominio citoplásmico del RTK por autofosforilación actúan como sitios de enlace para una proteína SH2 específica llamada Grb2, que se enlaza a la superficie interna de la membrana junto con otra proteína denominada Sos (fig. 15-26, *a*).⁵ En este punto es donde Ras entra en la descripción. En la célula no estimulada, Ras permanece enlazada a GDP. Cuando un ligando se enlaza a RTK y recluta a Grb2-Sos en la superficie interna de la membrana, la proteína Sos se enlaza a Ras, causando la pérdida de su GDP, que es reemplazada por GTP, activando de esta manera a Ras (fig. 15-26, *b*). La función primaria, y quizá la única, de Ras-GTP es reclutar otra proteína, llamada Raf, en la membrana plasmática (fig. 15-26, *c*). Una vez localizada en la membrana plasmática, Raf se convierte en una proteincinasa activa que inicia una cadena ordenada de reacciones de fosforilación denominada *cascada de proteincinasa activada por mitógeno* (cPAM),⁶ detallada en la figura 15-27. La cascada cPAM es similar a la de reacciones desencadenadas por AMPc durante la movilización de la glucosa (fig. 15-6), pero incluso más complicada (fig. 15-28).⁷ La última proteincinasa en la cascada (cPAM) entra al núcleo y fosforila factores de transcripción específicos. Estos factores de transcripción se enlazan a sitios sobre el DNA que contiene secuencias de nucleótidos conocidas como *elementos séricos de respuesta* (ESR), porque son activados por señales provenientes de factores de crecimiento presentes en el suero. Varios de los genes expresados codifican proteínas que se cree que participan en la activación del ciclo celular, que finalmente conduce al inicio de la síntesis de DNA y después a la división celular.

Al parecer, el núcleo no es el único objetivo de la cascada de proteincinasas activadas por mitógeno. Estudios recientes indican que otro objetivo es una proteína citoplásmica denominada PHAS-I (fig. 15-29). En estado no fosforilado, PHAS-I al parecer se enlaza a uno de los factores clave de inicio (eIF4E) requerido en células eucariotas para permitir que el ribosoma se fije al RNAm e inicie la traducción (pág. 472). En tanto PHAS-I permanezca enlazado al factor de inicio, dicho factor no puede realizar su papel en la síntesis de proteínas. En estado activado, cPAM añade un fosfato a PHAS-I, cambiando su conformación para desprenderlo de eIF4E, que a su vez permite al factor de inicio rea-

⁵ Grb2 es un acrónimo en inglés para receptor de factor de crecimiento que se enlaza a proteína, y Sos corresponde a son of sevenless, donde *sevenless* es un gen identificado en *Drosophila* que participa en la diferenciación de fotorreceptores.

⁶ cPAM (en inglés *MAP kinase*) es un acrónimo para proteincinasa activada por mitógeno, porque es una cinasa activada por factores de crecimiento que estimulan la mitosis (o sea, mitógenos). No debe confundirse con las cinasas que fosforilan proteínas relacionadas con microtúbulos, que se denominan PRM y que en inglés también aparecen como MAP.

⁷ En realidad, el cuadro es mucho más complejo de lo que se indica. Las células pueden tener varias vías cPAM distintas que constan de variantes en los diferentes elementos que constituyen la cascada. Por ejemplo, las células de levadura tienen cuando menos tres distintas vías cPAM que controlan la construcción de la pared celular, la respuesta al estrés osmótico y la respuesta a feromonas de apareamiento.

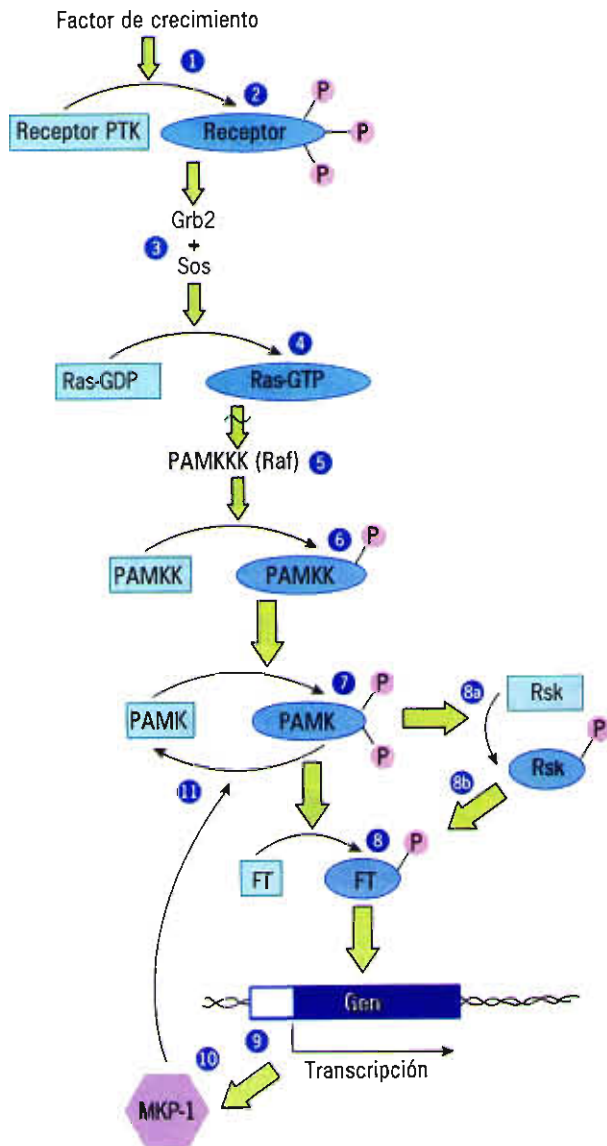


FIGURA 15-27. Etapas de la cascada cPAM. El enlace del factor de crecimiento a su receptor (1) conduce a la autofosforilación de los residuos de tirosina del receptor (2) y el subsecuente reclutamiento de las proteínas Grb2-Sos (3). Este complejo activado provoca el intercambio GTP-GDP de Ras (4), que recluta a la proteína Raf en la membrana activando su función serina-proteincinasa (5). Raf también se conoce como PAMKKK (PAM cinasa cinasa cinasa) porque fosforila a PAMKK (PAM cinasa cinasa, también conocida como MEK), activando por lo tanto su función cinasa (6). PAMKK es una cinasa de doble especificidad, término que significa que es capaz de fosforilar residuos de tirosina y también residuos de serina y treonina. Como su nombre implica, PAMKK fosforila a PAMK (cPAM) activando su función cinasa de serina y treonina (7). Se cree que cPAM activado fosforila cuando menos dos tipos de sustrato de proteína: factores de transcripción (FT, paso 8) y otra cinasa llamada Rsk (o p90^{msk}) (paso 8a), que a continuación fosforila a un factor de transcripción (8b). La fosforilación de los factores de transcripción incrementa su afinidad por sitios reguladores sobre el DNA, provocando un incremento de los genes específicos de transcripción que participan en la respuesta de crecimiento (paso 9). Uno de los genes cuya expresión se estimula codifica una cPAM fosfatasa (MKP-1) (paso 10). Se cree que esta enzima elimina grupos fosfato de cPAM (11), y por lo tanto inactiva la función cinasa de cPAM y detiene una mayor actividad de emisión de señales a lo largo de la vía. (Según H. Sun y N.K. Tonks, Trends Biochem. Sci. 19:484, 1994.)

lizar su papel en la traducción. A partir de estos datos parecería que la cascada cPAM desempeña un papel clave en la regulación de la transcripción y la traducción en la célula específica.

Generalidad de la cascada cPAM. En todos los eucariotes investigados, desde levaduras hasta moscas y de nematodos a mamíferos, se observa la misma vía básica desde RTK a través de Ras para la activación de los factores de transcripción. La evolución adaptó la vía para satisfacer muchos fines diferentes. Por ejemplo, en las levaduras, la cascada cPAM es necesaria para conservar la forma de la célula y responder a feromonas de apareamiento, en tanto que en la mosca de la fruta la vía se utiliza durante la diferenciación de los receptores en el ojo compuesto.

Como se analiza en el siguiente capítulo, los oncogenes pueden identificarse gracias a su capacidad para convertir a las células en células cancerosas cuando el gen sufre mu-

tación o activación anormal. Cuando se descubrieron los oncogenes se pronosticó que codifican proteínas cuyas contrapartes normales participan en el control del crecimiento celular. Esta predicción se ha confirmado repetidas veces. Por ejemplo, muchos de los elementos de la vía Ras para transmisión de señales son proteínas codificadas por genes descubiertos por primera vez como oncogenes causantes de cáncer. Esto incluye Ras, Raf y algunos factores de transcripción activados al final de la vía (p. ej., c-fos). Los genes de varios RTK situados al principio de la vía, incluyendo receptores para FCE y FCDP, también se identifican entre las diferentes docenas de genes conocidos como oncogenes. De todos los oncogenes, Ras parece desempeñar el papel más importante en el desarrollo del cáncer humano. El hecho de que tantas proteínas de esta vía sean codificadas por genes que pueden provocar cáncer cuando sufren mutación subraya la importancia de la vía en el control del crecimiento y proliferación celulares. Se espera que los conocimientos recientes en el papel de Ras en las actividades normales de la célula conduzcan a una mejor comprensión de los mecanismos encargados de la pérdida de control del crecimiento en las células cancerosas que contienen genes *ras* alterados y al desarrollo de mejores estrategias para el tratamiento del cáncer.

15-4 Convergencia, divergencia e interferencia entre diferentes sistemas de señales

La vía para la transmisión de señales mitógenas descrita antes e ilustrada esquemáticamente en la figura 15-27 es una vía lineal que conduce directo desde un receptor en la superficie celular al DNA en el núcleo de la célula. Aunque esta es la única vía en la cual se ha identificado cada eslabón de la cadena, no es la única vía disponible para transmitir

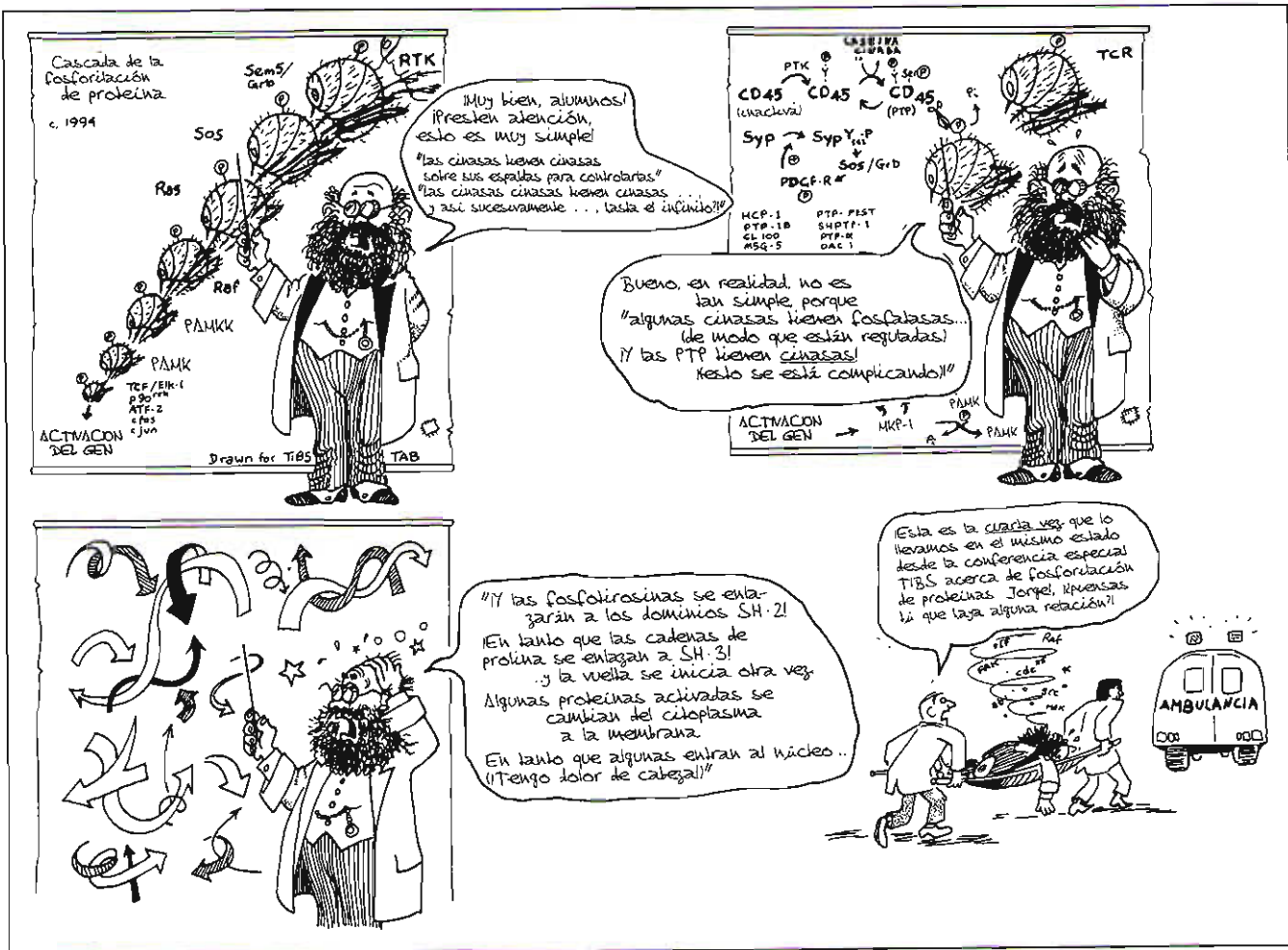


FIGURA 15-28. (Dibujo por Tony Bramley, Trends Biochem Sci. 19:469, 1994.)

señales desde la superficie celular por medio de un RTK activado. Los datos de estudios recientes indican que los circuitos de información dentro de la célula son complejos; por ejemplo:

- Señales procedentes de varios factores de crecimiento no relacionados, cada uno enlazado a su propio receptor, pueden converger para activar a un efector común, como Ras o proteína cinasa activada por mitógeno.

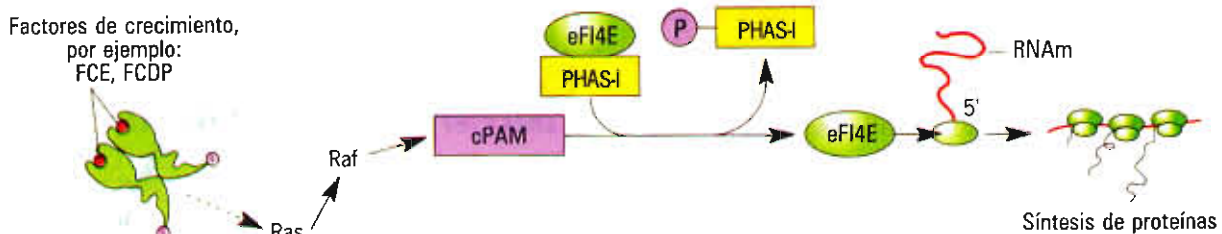


FIGURA 15-29. Papel de la cascada cPAM para controlar la traducción. La activación de la actividad cinasa de cPAM conduce a la fosforilación de la proteína PHAS-1, lo cual causa que se disocie del factor de inicio de traducción eIF4E, activando al factor y estimulando la síntesis de proteína.

- Señales del mismo ligando, como FCE o insulina, pueden divergir para activar varios efectores diferentes, lo que provoca respuestas celulares diversas.
- Pueden pasar señales hacia atrás y hacia delante en diferentes vías, fenómeno conocido como *interferencia*.

Estas características de las vías para transmisión de señales se ilustran esquemáticamente en la figura 15-30.

A partir de la figura 15-27 es evidente que la vía Ras desempeña un papel central para dirigir la información a través de la célula, de manera parecida a la orientación de la información en el sistema nervioso central desde los diferentes órganos del cuerpo y hacia ellos. El sistema nervioso central recoge información acerca del ambiente a través de los diferentes órganos de los sentidos, en tanto que la célula recibe información acerca de su ambiente a través de la estimulación de diferentes receptores en su superficie. Igual que los órganos de los sentidos sensibles a formas específicas de estímulos (p. ej., luz, presión u ondas sonoras), los receptores de la superficie celular sólo pueden enlazarse a ligandos específicos y no son afectados por la presencia de una gran variedad de moléculas no relacionadas. Una sola célula puede tener docenas de receptores diferentes capaces de enviar señales simultáneas al interior de la célula. Se cree que muchas de las señales que llegan a través de estos receptores lo hacen a través de la vía Ras. Las señales que abandonan la vía Ras pueden entonces canalizarse hacia vías orientadas "hacia afuera" que pueden provocar que la célula se divida, cambie de forma, active una vía metabólica

particular o incluso causen el suicidio de la célula, como se analizará en la siguiente sección. De esta manera, la célula al parecer es capaz de integrar la información que llega de diferentes fuentes y elaborar una respuesta integral apropiada.

Ejemplos de vías convergentes para transmisión de señales

Uno de los ejemplos más interesantes de convergencia de vías para la transducción de señales surgió recientemente de estudios acerca de la respuesta a insulina. En la página 648 se hizo notar que la insulina se enlaza a un receptor para insulina desencadenando la fosforilación de un sustrato del receptor para insulina y la activación de PI(3)K (fig. 15-24). La insulina también desencadena otras respuestas celulares, incluyendo activación de la síntesis de proteínas y estimulación del crecimiento. En la figura 15-31 se muestra la vía donde ocurre esto. La fosforilación del sustrato del receptor de insulina genera un sitio de estacionamiento para Grb2, la misma proteína SH2 que se une al FCE fosforilado o al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas. Por lo tanto, las vías para transmisión de señales iniciadas por el enlace de estos tres ligandos (FCE, FCDP e insulina) convergen para activar a Ras y a la cascada cPAM, lo que provoca la transcripción y traducción de un grupo similar de genes promotores de crecimiento en la célula específica.

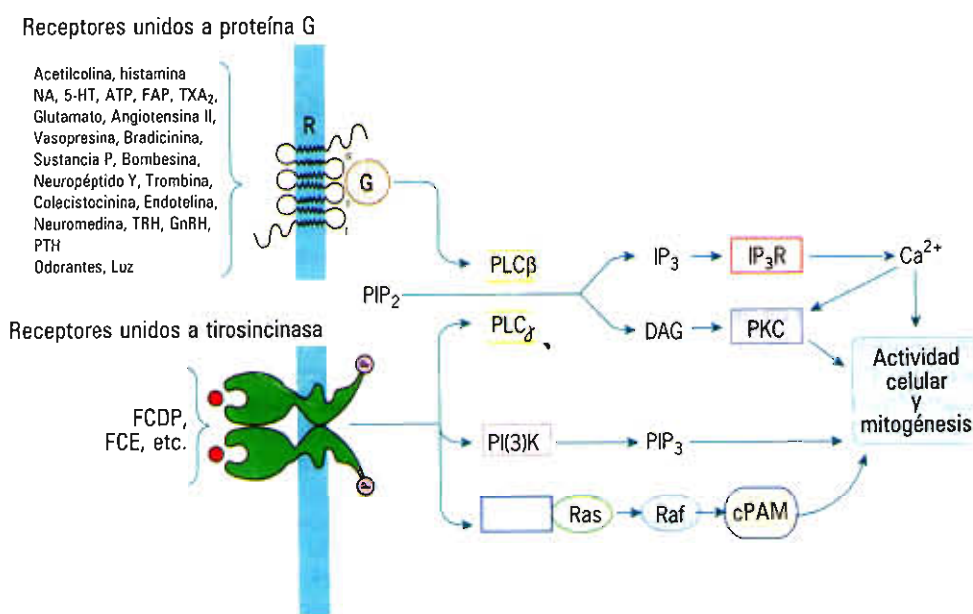


FIGURA 15-30. Ejemplos de convergencia, divergencia e interferencia entre diferentes sistemas de transducción de señales. Este dibujo muestra un esquema de las vías para transducción de señales iniciadas por receptores que actúan a través de proteínas G heterotriméricas y receptores de tirosincinasa. La dos vías convergen por activación de diferentes isoformas fosfolipasa C, y en ambas se producen los mismos segundos mensajeros (IP₃ y DAG). La activación del receptor de tirosincinasa por el FCDP o por el FCE conduce a la transmisión de señales a lo largo de tres vías diferentes, un ejemplo de divergencia. La interferencia entre los dos tipos de vías se ilustra por los iones calcio liberados del REL por IP₃ y que entonces pueden actuar sobre diferentes proteínas, incluyendo proteincinasa C (PKC) cuya actividad también es estimulada por diacilglicerol. (Según M.J. Berridge, reimpresso con permiso de Nature, vol. 361, p. 315, 1993. Copyright 1993 por Macmillan Magazines Limited.)

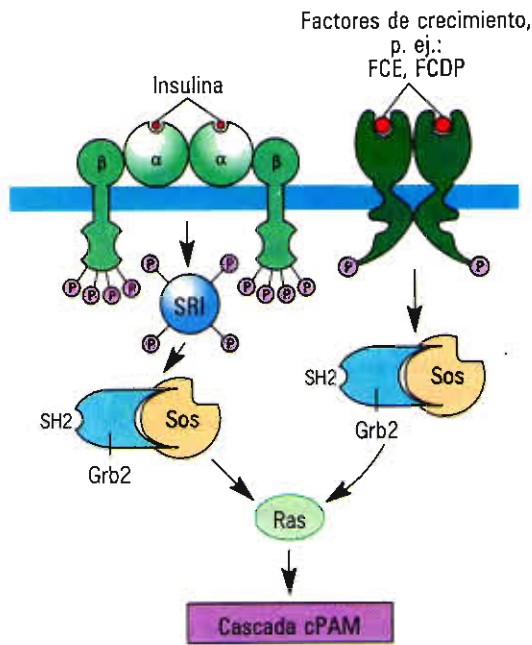


FIGURA 15-31. Las señales transmitidas desde el receptor de insulina y el receptor FCE o FCDP convergen sobre Ras y a continuación se transmiten a lo largo de la cascada de proteína activada por mitógeno.

Ejemplos de vías divergentes para transmisión de señales

En la sección previa vimos que el enlace del FCE o del FCDP a sus correspondientes receptores conduce a la autofosforilación del receptor y al reclutamiento de la proteína Grb2 SH2 en la membrana plasmática (fig. 15-26). Grb2 no es la única proteína que contiene un dominio SH2 que se enlaza a fosfotirosina capaz de enlazarse a un receptor FCE fosforilado o a un factor de crecimiento derivado de plaquetas. Cuando menos otras dos proteínas SH2, PI(3)K y fosfolipasa C, también se pueden enlazar a estos receptores (fig. 15-32) y activarse como resultado de esta interacción. Ambas enzimas fueron estudiadas anteriormente en relación con otro tipo de estímulo. PI(3)K se describió como enzima que fosforila al fosfatidilinositol (pág. 648), y la fosfolipasa C como enzima que desdobla el fosfatidilinositol fosforilado en IP_3 y DAG, ambos segundos mensajeros (pág. 639). Estas dos enzimas permanecen a la cabeza de sus propias vías para transmisión de señales, y por lo tanto el enlace de FCE o FCDP con sus correspondientes receptores no sólo envía una señal a lo largo de la vía Ras-cPAM, sino también a lo largo de vías separadas generadas por la fosforilación del inositol (fig. 15-32).

El término “Ras” se usa en dos contextos diferentes. Por una parte, Ras es una proteína específica, producto del gen *ras*. Por la otra, el término “Ras” se usa para describir una superfamilia de pequeñas proteínas homólogas enlazadas a GTP codificadas por cuando menos 50 genes diferentes. Las proteínas codificadas por varios de estos genes (princi-

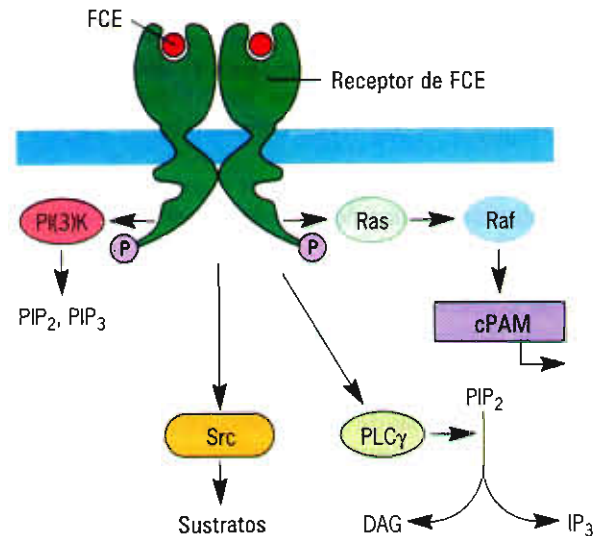


FIGURA 15-32. Las señales transmitidas desde el receptor del factor de crecimiento epidérmico pueden divergir hacia distintas vías.

palmente miembros de la subfamilia Rho) son elementos clave de las vías que transmiten señales desde los receptores de la membrana plasmática al citoesqueleto, provocando cambios en la disposición de los filamentos de actina que afectan la forma, la motilidad y las propiedades de adhesión de la célula. Los efectos de la inyección de una proteína Rho sobre la configuración del citoesqueleto de un fibroblasto activado se muestra en la figura 15-33.

Interferencia entre las vías para transmisión de señales

En las secciones previas examinamos algunas vías para transmisión de señales como si funcionaran de manera independiente siguiendo una cadena de sucesos lineales. En realidad, los circuitos de información que operan en las células probablemente recuerden más una red interconectada en la cual los elementos producidos en una vía pueden participar en lo que ocurre en otras vías. Cuanto más se conoce acerca de la información transmitida en las células, más se descubre acerca de interferencias entre las vías para transmitir señales. En vez de tratar de clasificar las vías que pasan información en una y otra dirección dentro de la célula, consideraremos un par de ejemplos que implican al AMPc para ilustrar la importancia en este tipo de interferencia.

El AMP cíclico se estudió en la página 631 como iniciador de una reacción en cascada que conduce a la movilización de la glucosa. Datos recientes indican que el AMPc también puede inhibir el crecimiento de varias células, incluyendo fibroblastos y adipositos, por bloqueo de las señales transmitidas a través de la cascada de la proteína activada por mitógeno. Se cree que el AMP cíclico realiza esto activando la cinasa dependiente de AMPc (PKA) capaz de fosforilar e inhibir a Raf, la proteína que permanece a la

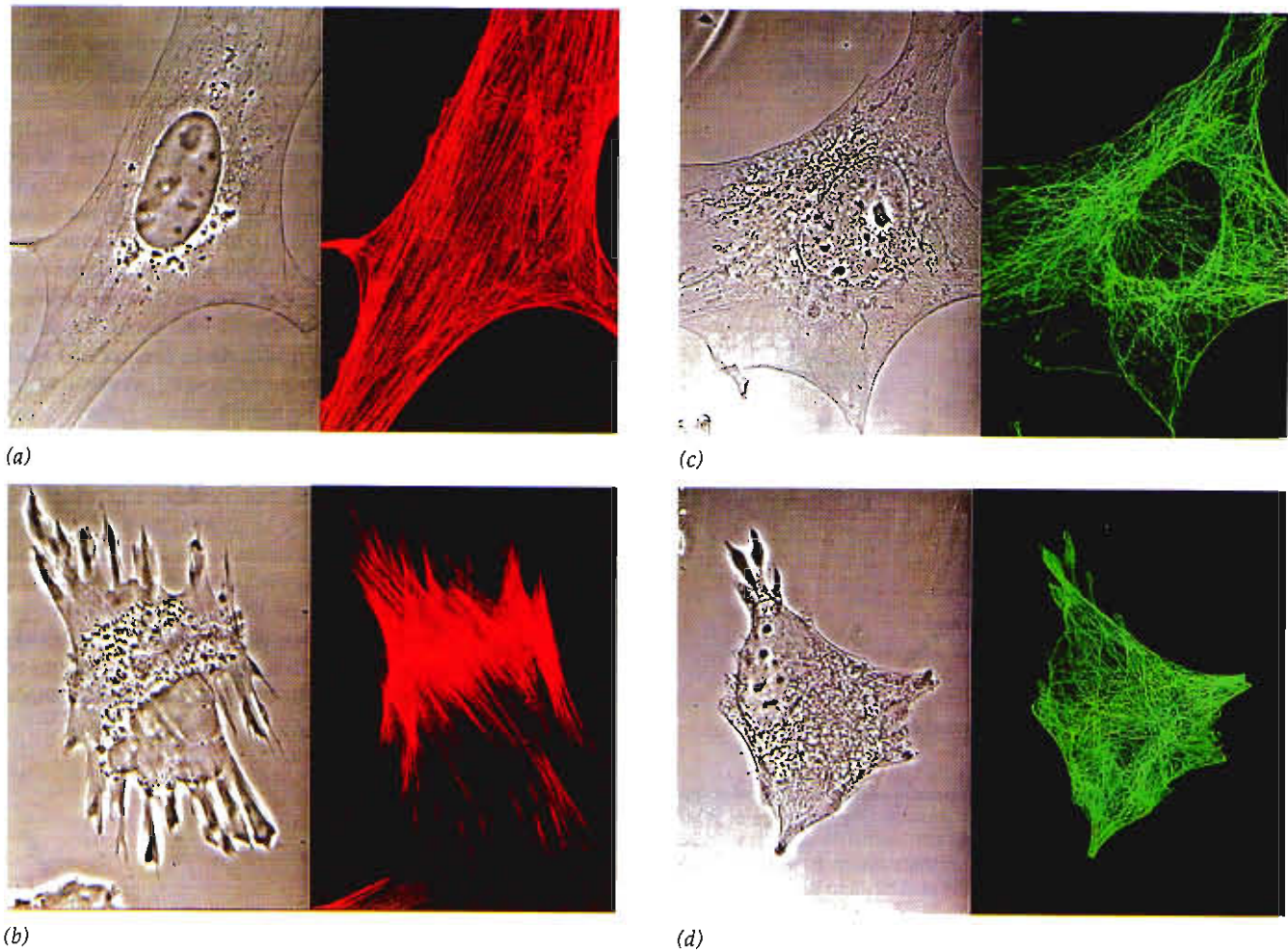


FIGURA 15-33. Resultados de un experimento en el cual se inyecta proteína de la familia Rho a un cultivo de fibroblastos. Las células no inyectadas se muestran en *a* y *c*, las células inyectadas con Rho se muestran en *b* y *d*. El aspecto de cada una de estas células en el microscopio de contraste de fases se muestra a la izquierda y la imagen inmunofluorescente de la célula correspondiente se muestra a la derecha. El espectacular efecto sobre la forma de estas células se observa comparando las micrografías del contraste de fases *a* y *b* o de *c* y *d*. Los correspondientes efectos sobre el citoesqueleto se observan comparando las imágenes por inmunofluorescencia. Las células en *a* y *b* fueron teñidas con faloidina fluorescente para revelar la distribución de filamentos de actina, en tanto que las células en *c* y *d* se tiñeron con anticuerpos fluorescentes contra tubulina para revelar la distribución de los microtúbulos. (Según Hugh F. Paterson y cols. *J. Cell Biol.* 111:1005, 1990; con permiso de Rockefeller University Press.)

cabeza de la cascada cPAM (fig. 15-34). En secciones previas se hizo notar en otro ejemplo que tanto Ca^{2+} como AMPc son segundos mensajeros que evocan respuestas distintas en células específicas. Pero estos dos mensajeros pueden tener efectos profundos sobre otras vías. Por ejemplo, Ca^{2+} (junto con calmodulina) puede activar a la adenililciclase (que sintetiza AMPc) y la AMPc fosfodiesterasa (que descompone a AMPc). Inversamente, la proteína cinasa dependiente de AMPc puede fosforilar los canales del ion calcio alterando su capacidad para liberar Ca^{2+} hacia el citoplasma. Además, varias proteínas, incluyendo el factor de transcripción CREB (pág. 631), la glucógeno sintasa y la fosforilasa cinasa, que desempeñan papeles importantes en el metabolismo de la glucosa, pueden ser fosforiladas por cinasa dependiente del AMPc y la cinasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina. Es evidente que las vías para transmi-

sión de señales de una célula son muy interdependientes, y que descifrar los factores que controlan a las vías de transmisión de información a través de los diferentes tipos de célula todavía mantendrán ocupados a los investigadores durante muchos años.

15-5 Otros sistemas de señales

Las vías mejor estudiadas para transmitir señales se inician por el contacto entre ligandos extracelulares y receptores acoplados a proteína G o receptores de tirosincinasa, pero también se han identificado muchos otros caminos que conducen desde el medio extracelular hasta el interior de la célula. Algunas de las vías más importantes se analizan en la siguiente sección.

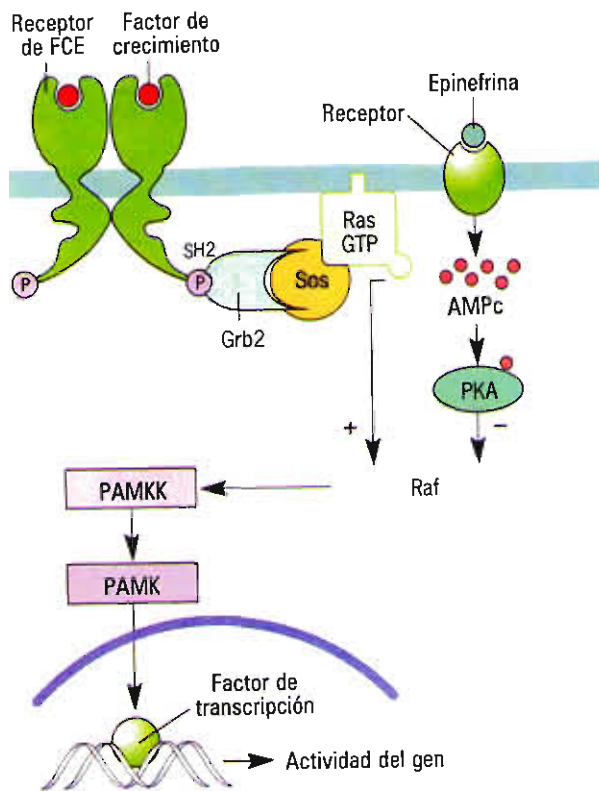


FIGURA 15-34. Ejemplo de interferencia entre dos vías principales para la emisión de señales. Las pruebas sugieren que el AMP cíclico puede actuar en algunas células por medio de una PKA cinasa dependiente de AMPc para impedir la transmisión de señales desde Ras a Raf, que tiene el efecto de inhibir la activación de la cascada de proteinquinasa activada por mitógeno.

Papel del NO y del CO como mensajeros celulares

En 1985 se aisló una cepa mutante de ratones cuyos macrófagos carecían de la capacidad habitual para fagocitar células anormales o bacterias. Estos ratones también mostraron anomalías en el metabolismo del nitrógeno. En tanto la inflamación resultante de la infección bacteriana se acompañó de incremento en la excreción de nitratos en la orina de ratones normales, en los miembros de esta cepa mutante no se observó esta respuesta. En aquel momento la relación entre inflamación y excreción de nitratos era totalmente confusa. Posteriormente se descubrió que la actividad fagocitaria en los macrófagos normales en cultivo de células dependía de la presencia de arginina en el medio; en ausencia de este aminoácido, los macrófagos eran incapaces de engullir materiales extraños. Pronto se descubrió que la arginina es un sustrato de una enzima llamada *sintasa de óxido nítrico*, que libera óxido nítrico (NO) como uno de los productos de oxidación de la arginina. A continuación el NO actúa como mensajero intracelular que estimula la actividad fagocitaria de la célula. Por lo tanto, la sustancia NO, alguna vez considerada sólo como contaminante tóxico de la atmósfera, resultó ser un mensajero fisiológico esencial.

La desactivación metabólica del NO genera los nitratos que aparecen en la orina de animales cuyos macrófagos participan en actividad fagocitaria extensa durante la inflamación.

El óxido nítrico resultó ser un mensajero en un número cada vez mayor de actividades biológicas. Por ejemplo, las células endoteliales que revisten la superficie interna de los vasos sanguíneos producen NO en respuesta a la acetilcolina liberada por nervios autónomos que inervan a los vasos (fig. 15-35). El enlace de acetilcolina a la superficie externa de la célula endotelial (paso 1, fig. 15-35) indica elevación de la concentración citoplásmica de Ca^{2+} (paso 2), que activa a la sintasa de óxido nítrico (paso 3). El NO formado en las células endoteliales difunde a través de la membrana plasmática al interior de las células de músculo liso adyacentes (paso 4), donde estimula a la guanililciclase (paso 5), enzima que sintetiza GMP cíclico (GMPc), un segundo mensajero importante de estructura similar a AMPc. El GMP cíclico desencadena la respuesta que conduce a la relajación de la célula muscular (paso 6) y la dilatación subsecuente del vaso sanguíneo. El descubrimiento de la dilatación de vasos sanguíneos mediada por NO explica la acción de la nitroglicerina, empleada durante muchos años para tratar el dolor de la angina de pecho resultante de flujo sanguíneo inadecuado al miocardio. La nitroglicerina se desintegra en el cuerpo para formar óxido nítrico, que estimula la relaja-

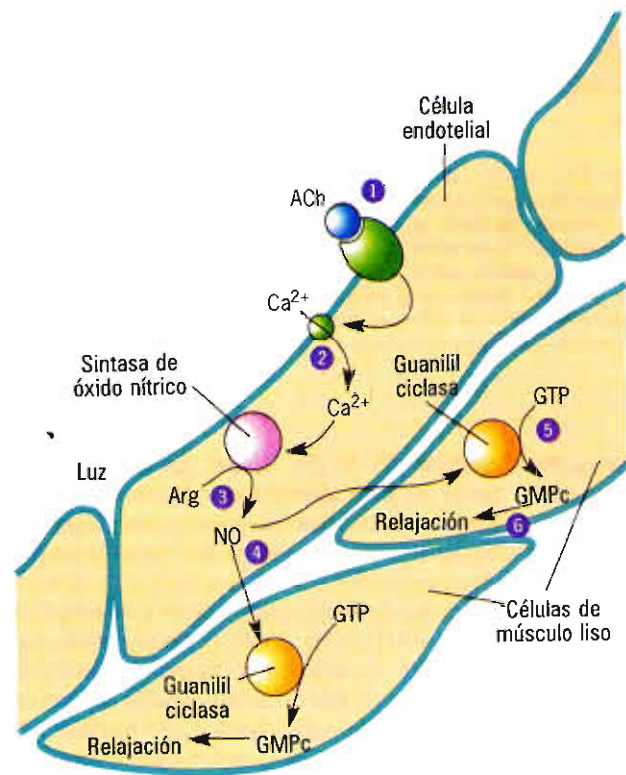


FIGURA 15-35. Vía para la transducción de señales que incluye NO y GMP cíclico, que produce dilatación de los vasos sanguíneos. Los pasos ilustrados en la figura se describen en el texto. (Según R.G. Knowles y S. Moncada, Trends Biochem Sci. 17:401, 1992.)

ción de los músculos lisos que revisten los vasos sanguíneos del corazón incrementando el flujo de sangre a ese órgano. Muchos investigadores piensan que la producción de NO en el cuerpo es el determinante aislado más importante de la presión arterial de una persona.

Las concentraciones más elevadas de sintasa de óxido nítrico se encuentran en las células nerviosas localizadas en ciertas partes del cerebro y en los nervios raquídeos que inervan varios órganos periféricos. Se cree que el NO producido en las neuronas actúa como neurotransmisor para producir respuestas específicas en células blancas, incluyendo las contracciones peristálticas de la capa de músculo liso del intestino y el llenado con sangre del pene durante la erección.

La investigación acerca de la NO sintasa condujo a los investigadores a otra enzima, la hem oxigenasa, que cataliza la destrucción del grupo hem de la hemoglobina eliminada de las células sanguíneas viejas y gastadas. Pero la hem oxigenasa también se encuentra en concentraciones relativamente altas en ciertas células nerviosas, donde es muy poco probable que participe en la degradación del hem. El papel de la hem oxigenasa en las células nerviosas es más evidente que cuando se comprueba que uno de los productos de la reacción que cataliza es el monóxido de carbono (CO), el cual, igual que el NO, es un contaminante tóxico de la atmósfera. Cada vez se acumulan más pruebas de que el CO actúa como mensajero químico para estimular la producción de GMPc en células específicas. La demostración de un papel para el CO en la función nerviosa proviene del estudio de neuronas olfatorias, que normalmente responden a la presencia de moléculas odorantes estimulantes con elevación de la concentración de GMPc. Cuando se trata a animales con un fármaco que inhibe la hem oxigenasa, la GMPc ya no se eleva en las neuronas olfatorias.

Señales originadas por contactos en la superficie celular

Todas las señales estudiadas antes se originan por interacción de la célula con sustancias disueltas en su ambiente. Las células también pueden responder a contactos que hacen con objetos insolubles en su ambiente, incluyendo sustratos no celulares (como membranas basales) y las superficies de otras células. En el capítulo 7 se describió de qué manera las células desarrollan contactos altamente especializados con otras células y con la matriz extracelular. Típicamente, estos contactos son sitios donde ciertos tipos de proteínas de membrana se agrupan y actúan como puentes entre el objeto extracelular con el que hacen contacto y las disposiciones específicas de elementos citoesqueléticos situados en la superficie interna de la membrana plasmática. Se cree que estas proteínas de membrana y las regiones especializadas del citoesqueleto actúan en conjunto como conductos para transmitir señales desde el medio externo hasta el interior de la célula.

De los diversos tipos de proteínas de membrana que participan en la transmisión de señales celulares desde "el exterior al interior", las integrinas están sometidas a mayor investigación. Como se estudió con detalle en el capítulo 7, las integrinas son los receptores de membrana constituidos

por proteínas diméricas que se encuentran en sitios de célula-sustrato y en contacto célula-célula. Numerosos datos indican que la interacción entre el dominio extracelular de una integrina con un ligando extracelular, como una molécula de fibronectina de la matriz extracelular, genera señales en la célula que pueden conducir a la liberación de Ca^{2+} al interior del citoplasma, a incremento de la síntesis de segundos mensajeros de inositol, a incremento del grado de fosforilación de tirosina de las proteínas celulares y a cambios en la expresión de genes. Uno de los efectores causantes de dichos cambios es una proteína tirosinasa llamada *cinasa de adherencia focal* (CAF), así denominada porque se concentra en adherencias focales, o sea, sitios especializados en la membrana plasmática donde las células hacen contacto con el sustrato (pág. 249). Se cree que la cinasa de adherencia focal actúa como efector en las respuestas mediadas por integrina que requieren reorganización del citoesqueleto, lo que puede afectar el curso del desarrollo y la conducta celulares. La figura 15-36 muestra las adherencias focales presentes donde la superficie subyacente de fibroblastos de rata entran en contacto con el plato de cultivo. Los filamentos de actina aparecen de color verde en la micrografía, en tanto que los residuos de fosfotirosina al parecer generados por CAF se tiñen de rojo. Las áreas de color naranja son sitios donde los microfilamentos y los residuos de fosfotirosina coinciden en la adherencia focal.

La cinasa de adherencia focal también se considera como un efector que desencadena la agregación de plaquetas, los elementos no nucleados de la sangre encargados del cierre de las heridas en los vasos sanguíneos. La agregación de plaquetas se estimula por contacto de sus superficies con ciertas proteínas sanguíneas, como el fibrinógeno (fig. 7-15). Los datos indican que el enlace de fibrinógeno al dominio

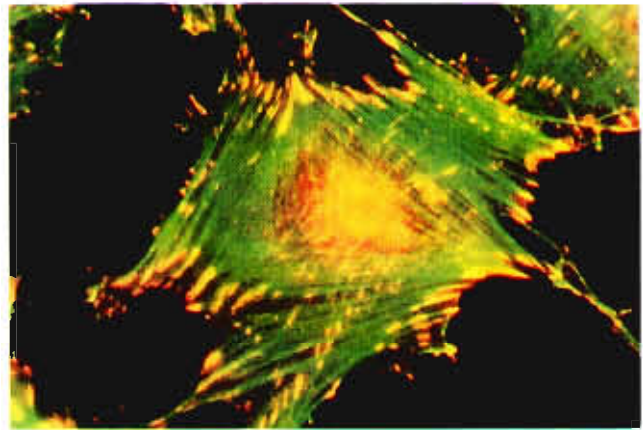


FIGURA 15-36. Demostración experimental de la presencia de residuos de fosfotirosina en los sitios de adherencia focal en fibroblastos de rata. Los filamentos de actina, que se irradian a partir de las áreas de contacto en las adherencias focales, están teñidos con faloidina conjugada a fluoresceína (verde). Los residuos de fosfotirosina se localizan mediante un anticuerpo fluorescente rojo. Los sitios de superposición de los filamentos de actina y residuos de fosfotirosina en las regiones de contacto focal aparecen de color naranja. (Cortesía de Keith Burridge.)

extracelular en la membrana plasmática de la plaqueta transmite una señal a través de la membrana que activa las moléculas de cinasa de adherencia focal citoplásmicas (fig. 15-37), lo que conduce a la fosforilación de proteínas citoplásmicas necesarias para la agregación. Esto explicaría por qué las plaquetas de pacientes que padecen trombostenia de Glanzmann, quienes carecen de esta integrina particular, no se pueden activar por fibrinógeno.

Papel de las fosfatasa en la transmisión de señales celulares

En este capítulo se subraya el papel de las proteincinasas para estimular (e inhibir) la actividad de otras proteínas. La fosforilación de proteínas es una modificación reversible, de modo que cualquier fosfato añadido por una proteincinasa puede eliminarse mediante una proteinfosfatasa. Por lo tanto, las cinasas y las fosfatasa muestran efectos opuestos sobre su sustrato: cuando la fosforilación activa al sustrato, la desfosforilación lo inactiva, y viceversa. Igual que las proteincinasas, algunas fosfatasa son multifuncionales y capaces de eliminar fosfatos de varias proteínas diferen-

tes, en tanto que otras son muy específicas y sólo pueden eliminar fosfatos de uno o dos sustratos. La mayor parte de las fosfatasa, como las cinasas que revierten, pueden extraer fosfatos, sea de residuos de serina y treonina o de residuos de tirosina, pero no de ambos. Sin embargo, se conocen unas pocas fosfatasa con doble especificidad capaces de eliminar fosfatos de los tres tipos de residuos aminoácidos.

Todas las proteinfosfatasa estudiadas hasta ahora son enzimas citoplásmicas solubles. Recientemente, se descubrió una nueva clase de fosfatasa que atraviesan la membrana plasmática y al parecer actúan como receptores de superficie celular que participan en la transmisión de señales celulares y en la adherencia entre células. Estas moléculas se denominan *fosfatasa parecidas a receptores de proteintirosina (FRPT)*. El papel de las FRPT como moléculas de adherencia celular fue sugerido por experimentos en los cuales un gen de una de estas proteínas (FRPT_m) se introdujo en células de insectos normalmente no adherentes entre sí. Luego de captar al gen y expresar el producto en su superficie, estas células transfectadas se agregaron para formar grumos (fig. 15-38) asociados por interacciones específicas entre las células FRPT con sus vecinas. La porción extracelular de FRPT contiene dominios similares a los observados en otras moléculas para adherencia celular, incluyendo fibronectina (pág. 243), y se cree que suministran un enlace directo entre los procesos de adherencia celular y la transmisión de señales a través de la membrana.

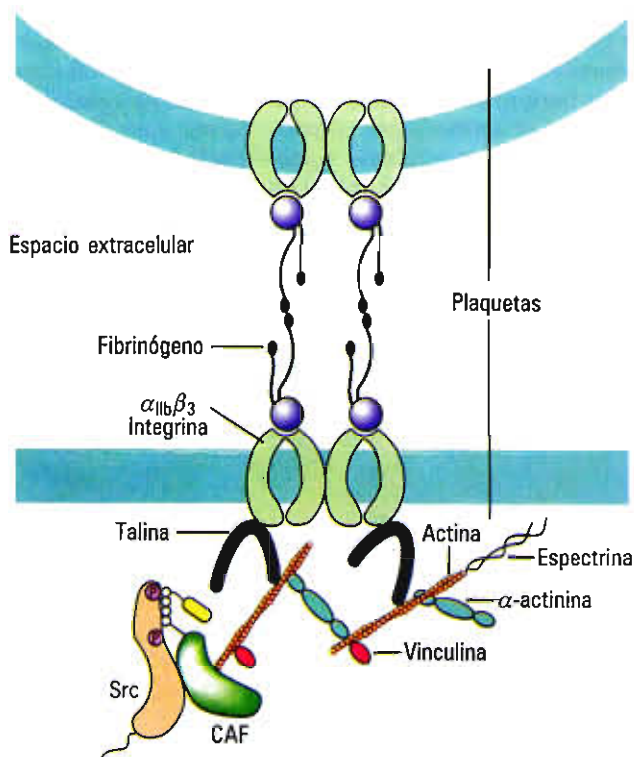
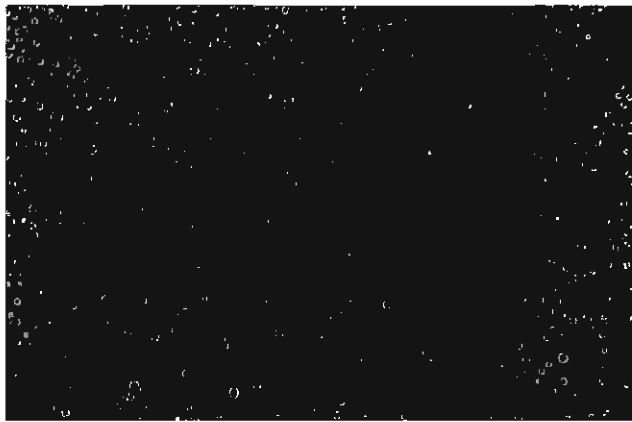


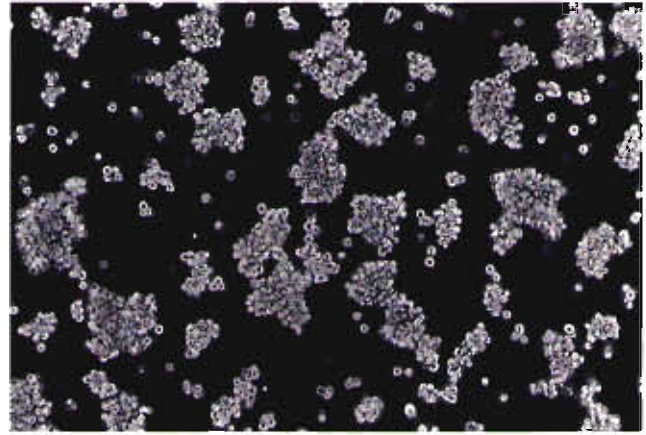
FIGURA 15-37. Activación de la cinasa de adherencia focal (CAF) en las plaquetas sanguíneas. La interacción del fibrinógeno en la superficie extracelular de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ conduce a la transmisión de una señal a través de varias proteínas relacionadas con la membrana (incluyendo talina y actina) hacia la CAF, activada para fosforilar varias proteínas de sustrato incluyendo Src, que es una tirosincinasa. Estas acciones promueven la agregación de plaquetas. (Según E.A. Clark, S.J. Shattil y J.S. Bruce, Trends Biochem Sci. 19:467, 1994.)

Vías que conducen a la muerte celular

Consideremos los siguientes acontecimientos, los cuales ocurren durante el desarrollo embrionario: muchas más neuronas salen del sistema nervioso central en dirección a un órgano específico que las requeridas para inervar dicho órgano; se producen linfocitos T (células inmunológicas encargadas de destruir células anormales o infectadas) que tienen capacidad de atacar a las propias células del cuerpo; las formas más primitivas de la mano del ser humano recuerdan una paleta sin espacio alguno entre los tejidos que se convertirán en los dedos. En cada una de estas situaciones, las células que ya no son necesarias (como las neuronas en exceso o las células situadas entre los dedos) o que poseen la capacidad de dañar al individuo (como los linfocitos T) sufren un proceso llamado **apoptosis**. A diferencia de la muerte de las células que se produce por lesiones tisulares (suceso denominado *necrosis*), la apoptosis es un tipo de muerte celular ordenada, o *programada*, en la cual la célula responde a ciertas señales iniciando una respuesta normal que conduce a su propia muerte. Se cree que la apoptosis requiere la activación de un conjunto específico de genes que ha evolucionado para destruir a la célula de manera que su muerte tenga el menor efecto sobre el ambiente que la rodea. La muerte por apoptosis se caracteriza por la compactación total de la célula y su núcleo (fig. 15-39), la disecación ordenada de la cromatina en pedazos por acción de una endonucleasa especial que separa DNA, y el rápido engullimiento de la célula muerta por fagocitosis. Como se ilustra en los ejemplos anteriores, la apoptosis es un suceso común durante el desarrollo embrionario, pero también ocu-



(a)



(b)

FIGURA 15-38. Resultados de un experimento que sugieren que las fosfatasa parecidas a receptores de proteintirosina puede participar en la adherencia célula-célula. *a)* Las células testigo muestran poca tendencia a adherirse entre sí. *b)* Las células del mismo tipo mostradas en *a* fueron manipuladas por ingeniería genética para expresar una fosfatasa similar a receptor de proteintirosina sobre su superficie. A diferencia de las células testigo, las células manipuladas genéticamente se adhieren entre sí formando grumos. (Según Martijn Gebbink y Gerben Zondag, *Science* 261:833, 1993; reimpresso con permiso.)

re en tejidos adultos y puede ser un arma particularmente importante para la destrucción de células que potencialmente pueden desarrollarse para formar tumores malignos (comentado en la sección 16-3).

En este momento se sabe muy poco acerca de las vías para transmitir señales que inducen a una célula a suicidarse, pero esto tal vez cambie en los siguientes años, puesto

que ahora la investigación se ha enfocado en la apoptosis. Las pruebas sugieren que la apoptosis puede desencadenarse por algunas condiciones externas, según el tipo de célula. Muchas células cultivadas diferentes son estimuladas a entrar en apoptosis cuando se eliminan factores de crecimiento del medio; quizá la disyuntiva sea crecer y dividirse o morir. Las células epiteliales de la próstata entran

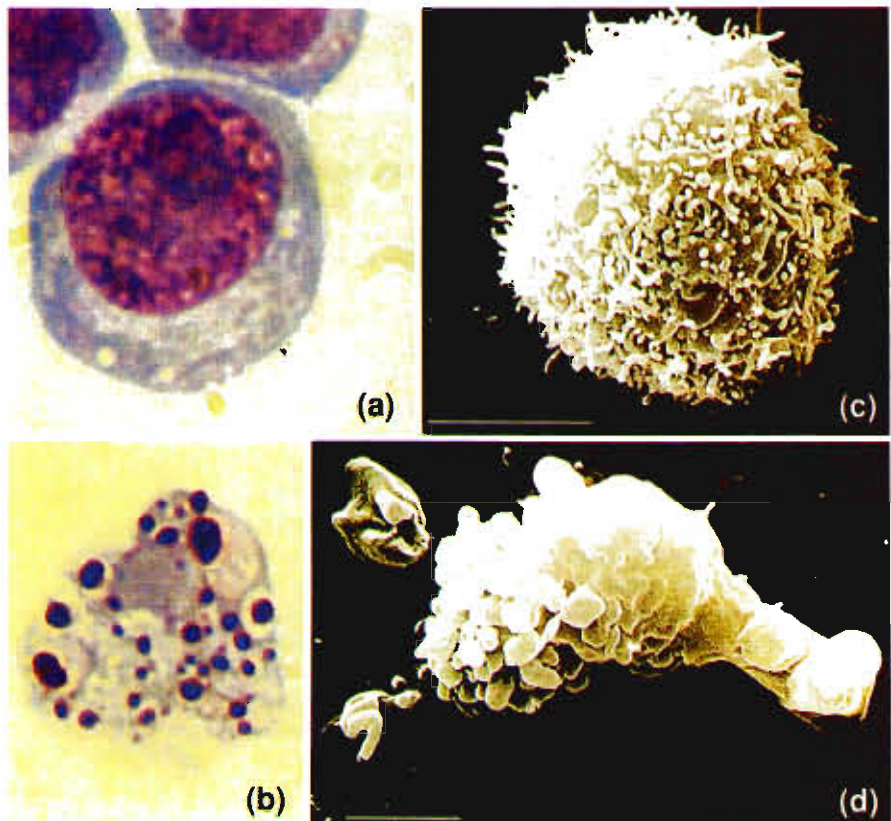


FIGURA 15-39. Comparación de células normales y células apoptóticas. *a-b)* Micrografías con microscopio de luz de una célula cultivada HL-60 normal (*a*) y una apoptótica (*b*). El núcleo de la célula apoptótica está altamente condensado y fragmentado. *c-d)* Micrografías electrónicas de una célula T híbrida normal (*c*) y apoptótica (*d*). La célula apoptótica muestra muchas burbujas en su superficie que brotan desde el interior de la célula. (Según Seamus J. Martin, Douglas R. Green y Thomas G. Cotter, *Trends Biochem Sci.* 19:28, 1994. Micrografía electrónica por Y. Shi y D.R. Green.)

en apoptosis cuando se suprime la hormona sexual masculina testosterona. Esta es la razón de que el cáncer prostático propagado a otros tejidos se pueda tratar con fármacos que interfieran con la síntesis de testosterona. Cualesquiera que sean las señales externas que desencadenan la apoptosis, al parecer el proceso es mediado principalmente por liberación de Ca^{2+} al interior del citoplasma y la activación de proteincinasas.

Sistemas para transmisión de señales en plantas

La investigación acerca de las vías para transmitir señales en células vegetales ha permanecido muy por detrás de los

estudios en células animales, pero se está efectuando un número cada vez mayor de estudios en plantas. Los datos de estos estudios indican que las plantas y los animales comparten ciertos mecanismos básicos para transmitir señales, incluyendo el uso de Ca^{2+} (pág. 641) y de mensajeros fosfoinositídicos, pero que ciertas vías son peculiares de cada reino. Por ejemplo, los nucleótidos cíclicos, que pueden ser el mensajero celular más ubicuo en animales, al parecer desempeñan un papel sin importancia, si es que tiene alguno, en la transmisión de señales en células vegetales. Por otra parte, como se estudia a continuación, las plantas contienen un tipo de proteincinasa ausente en células animales.

Desde hace mucho se sabe que las células bacterianas contienen una proteincinasa capaz de fosforilar residuos de histidina y desempeña un papel clave en la mediación de la

LA VIA EXPERIMENTAL

Descubrimiento y caracterización de las proteínas enlazadas a GTP

A finales de los años 1950 y 1960, Earl Sutherland y sus colegas, en la Case Western Reserve University, descubrieron que ciertas hormonas, como la epinefrina, actúan al enlazarse a un receptor específico en la superficie de la célula que activa a la enzima adenililciclase sobre el lado interno de la membrana. La activación de la adenililciclase induce la producción de un segundo mensajero, AMP cíclico, que se difunde al citoplasma e inicia la respuesta celular.¹ A finales del decenio de 1960, el concepto de segundo mensajero estaba ya bien establecido, pero poco se sabía acerca del mecanismo molecular preciso que permite a una hormona (u otro ligando) enlazada en el exterior de la membrana activar la adenililciclase. Una posibilidad era que el sitio activo de la adenililciclase fuera parte del propio receptor de la hormona.

Para conocer más acerca de la relación entre receptores hormonales y adenililciclase, Martin Rodbell y Lutz Birnbaumer, de los National Institutes of Health, comenzaron una serie de experimentos sobre membranas plasmáticas aisladas de adipocitos y células hepáticas.² Una de las primeras preguntas que intentaron responder fue si estas células, que responden a varias hormonas diferentes produciendo AMPc, poseen una sola adenililciclase activada por las diferentes hormonas o tienen diferentes adenililciclasas para cada una de las hormonas a las cuales responden. Se eligieron células adiposas para los estudios iniciales debido a que son fáciles de aislar y liberar de otros tipos de célula, responden a varias hormonas que causan rápido incremento en la concentración intracelular de AMPc (estimulando enzimas que participan en la descomposición de lípidos), y sus membranas plasmáticas pueden aislarse como "fantasmas" mediante lisis osmótica. Seis hormonas diferentes (ACTH, epinefrina, glucagon, TSH, LH y

prolactina) mostraron acción estimulante sobre la actividad de adenililciclase en fantasmas de células adiposas aisladas. En la figura VE 15-1 se muestran las curvas de dosis y respuesta de las primeras tres de estas hormonas actuando por separado. Como se muestra en el cuadro PH 15-1, cuando estas hormonas se combinan en grupos de dos o tres, sus efectos sobre la actividad de adenililciclase no son aditivos, lo que sugiere que cada una de estas hormonas estimula a la misma población de moléculas de adenililciclase. En experimentos subsecuentes se demostró que las diferentes hormonas interactúan con receptores espacialmente distintos. Estos datos juntos condujeron a Rodbell y Birnbaumer a proponer que, aunque los diferentes receptores hormonales estimulan una población común de moléculas de adenililciclase, los receptores adenililciclase existen por separado en la membrana plasmática de las células adiposas.

En 1971, Rodbell y sus colegas publicaron una serie de trabajos acerca de la actividad de glucagon y epinefrina sobre la estimulación de adenililciclase en membranas plasmáticas aisladas de células hepáticas. Una de las técnicas adoptadas en estos estudios fue vigilar la capacidad de las moléculas de glucagon marcadas con isótopos radiactivos para enlazarse a sus correspondientes receptores sobre las membranas plasmáticas aisladas. Puesto que el ATP es un sustrato de la reacción adenililciclase, se pudo vigilar el efecto de la presencia del ATP sobre el enlace del glucagon marcado, y también los efectos de los otros tres trifosfatos de nucleósido comunes, UTP, CTP y GTP. Durante estas investigaciones se notaron por primera vez los efectos especiales de GTP.³

Uno de los efectos observados de los trifosfatos de nucleósido fue que causan disociación del glucagon marcado enlaza-

respuesta celular a varias señales ambientales desencadenando cambios en la expresión de genes o modificando la conducta de la célula. Hasta 1993, se pensaba que estas enzimas se restringían a células bacterianas, pero entonces se descubrieron tanto en levaduras como en plantas que producen flores. En ambos tipos de eucariotes, las enzimas son proteínas transmembrana que se cree poseen un dominio receptor extracelular y un dominio histidincinasa citoplásmico. Las señales generadas por estas enzimas al parecer alimentan a una cascada de proteincinasa activada por mitógeno. Las pruebas indican que la histidincinasa de plantas (codificada por el gen *Etr1*) desempeña un papel clave en la respuesta del organismo al gas etileno, hormona que regula el crecimiento e induce la maduración de las frutas.

Otra vía única para transmisión de señales de las plantas se inicia por el ataque de un microorganismo patógeno o de una plaga de insectos. La porción dañada de la planta responde a la amenaza produciendo un mensaje químico, que se cree está compuesto de ácido salicílico (un sucedáneo de la aspirina, que es el ácido acetilsalicílico). El ácido salicílico (AS) se propaga por toda la planta y es detectado por una proteína que se enlaza al AS, probablemente la enzima catalasa. La catalasa es una enzima protectora que destruye especies reactivas de oxígeno (pág. 199). Cuando el AS se enlaza a la enzima, inhibe su actividad catalítica conduciendo a la formación de ciertas especies de oxígeno que pueden actuar como segundos mensajeros para generar una respuesta sistémica de defensa.

do a las membranas plasmáticas aisladas. En tanto ATP, UTP y CTP no afectan la disociación del glucagon de las membranas en concentraciones menores de $100\ \mu\text{M}$, GTP estimula la disociación a concentraciones tan bajas como $0.05\ \mu\text{M}$. En la figura VE 15-2 se comparan los efectos de ATP y GTP para provocar la disociación del glucagon de las membranas. (Nótese que la concentración se grafica en una escala logarítmica indicando diferencias muy grandes en la eficacia de los dos trifosfatos.) Estos resultados sugirieron a los autores que los nucleótidos de guanilo inducen un cambio en el estado o las propiedades de los sitios de enlace del glucagon que disminu-

yen su afinidad por glucagon. Además, se observó que las membranas de hígado poseen una actividad nucleotidasa capaz de hidrolizar GTP y que esta actividad GTPasa es inhibida por EDTA, un compuesto que se enlaza a iones calcio y magnesio.

En el último trabajo publicado de la serie, intentaron responder la pregunta de si los efectos de los nucleótidos de guanilo sobre el enlace de glucagon implica alguna relación con las acciones de glucagon sobre el sistema adenililciclase de las membranas hepáticas.⁴ Como se muestra en la figura VE 15-3, el GTP estimula la actividad basal de adenililciclase y lo hace a concentraciones tan bajas como $10\ \text{nM}$. Ninguno de los otros nucleótidos pose esta actividad. Los autores concluyeron que los nucleótidos de guanilo son necesarios para que el glucagon active la adenililciclase. Los nucleótidos se enlazan a sitios distintos de los sitios de enlace de glucagon y al parecer

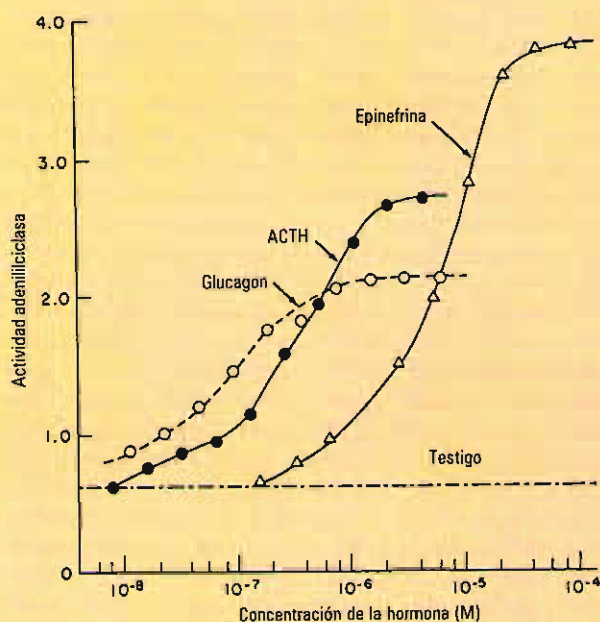


FIGURA VE 15-1. Efecto de concentraciones variables de ACTH, epinefrina y glucagon sobre la actividad de adenililciclase de fantasmas de células adiposas. La línea punteada representa la actividad en ausencia de hormonas añadidas (la adenililciclase inicialmente se denominó adeniliciclase y posteriormente se le llamó adenilato ciclase). (Según L. Birnbaumer y M. Rodbell, *J. Biol. Chem.* 244:3478, 1969.)

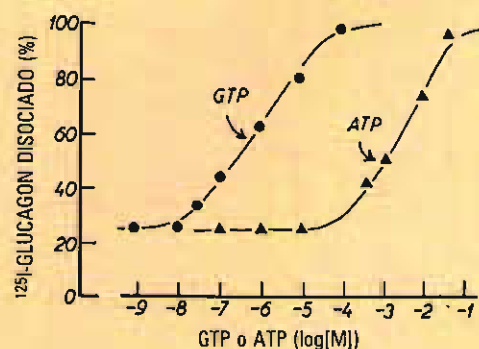


FIGURA VE 15-2. Efecto de concentraciones variables de GT y ATP sobre la disociación de ^{125}I -glucagon de las membranas plasmáticas de células hepáticas. En este experimento las membranas se incubaron previamente durante 15 minutos en un medio que contenía glucagon marcado. A continuación se añadió GTP o ATP en presencia de un gran exceso de glucagon no marcado. Luego de 15 minutos de incubación en uno u otro trifosfato de nucleósido, se tomaron muestras para medir el glucagon marcado que permanecía enlazado. El porcentaje de glucagon marcado enlazado que se disocia durante la incubación con ATP o con GTP se calculó comparando la radiactividad de enlace presente al inicio y al final de los 15 minutos de incubación con el trifosfato de nucleósido. (Según M. Rodbell y cols. *J. Biol. Chem.* 246:1873, 1971.)

CUADRO VE 15-1. Efectos de las combinaciones de hormonas, a concentración supramáxima, sobre la actividad de adenililciclase en fantasmas de células grasosas*

Adiciones	Cambio de la actividad de adenililciclase debido a hormonas			
	Experimento 1 (37°)		Experimento 2 (30°)	
	Encontrado	Calculado si se añade	Encontrado	Calculado si se añade
ACTH	0.57 ± 0.02		1.19 ± 0.07	
Epinefrina	1.00 ± 0.06		1.79 ± 0.11	
Glucagon	0.32 ± 0.01		0.57 ± 0.04	
ACTH + epinefrina	0.80 ± 0.04	1.57	2.04 ± 0.12	2.98
Epinefrina + glucagon	0.99 ± 0.05	1.26	2.13 ± 0.10	2.36
ACTH + glucagon	0.64 ± 0.02	0.89	1.33 ± 0.06	1.76
ACTH + epinefrina + glucagon	0.85 ± 0.04	1.88	2.30 ± 0.10	3.55

* La actividad de la adenililciclase se calculó a 37° en ausencia del sistema de regeneración de ATP o a 30° en presencia del mismo. Se usaron las siguientes concentraciones de la hormona, tanto individualmente como de manera combinada: ACTH, 400 µg por ml; epinefrina, 400 µg por ml; glucagon, 60 µg por ml. Los valores son el medio de triplicar determinaciones ± desviación estándar.

FUENTE: L. Birnbaumer y M. Rodbell, *J. Biol. Chem.* 244:3479, 1969.

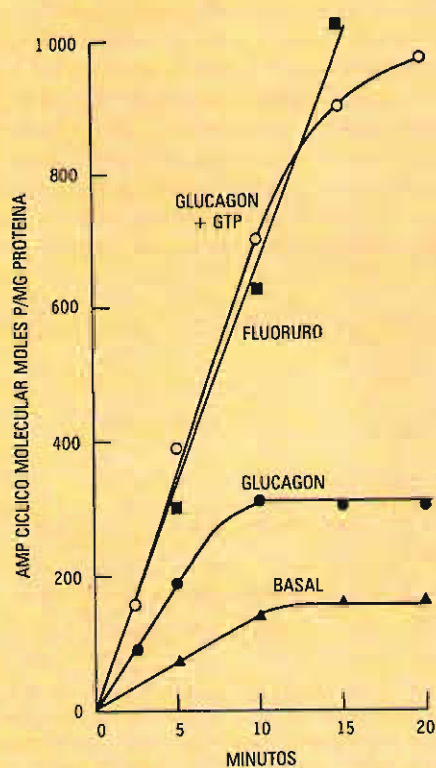


FIGURA VE 15-3. Efecto del ion fluoruro, glucagon y una combinación de glucagon y GTP sobre la síntesis de AMP cíclico con una preparación de membranas plasmáticas aisladas de células hepáticas. La notable estimulación del GTP aquí mostrada se logró con una concentración de GTP de 0.01 mM. También se encontró que el ion fluoruro es un activador eficaz de adenililciclase y se empleó en un gran número de ensayos subsecuentes. (Según M. Rodbell y cols. *J. Biol. Chem.* 246:1879, 1971.)

regulan la respuesta de adenililciclase a la hormona. Estudios subsecuentes en otros laboratorios demostraron que GTP incrementa la respuesta de los sistemas adenililciclase a otras hormonas, incluyendo hormonas de péptidos, catecolaminas (p. ej., epinefrina) y prostaglandinas.

Los análogos no hidrolizables de los trifosfatos de nucleósido son útiles porque permiten a los investigadores distinguir entre los efectos del enlace de nucleótidos y la hidrólisis de nucleótidos. Cuando un análogo no hidrolizable de GTP, 5'-guanililimidodifosfato, o Gpp(NH)p, se incubaba con membranas plasmáticas de hígado, glucagon, ATP y otros ingredientes necesarios para el sistema adenililciclase, Gpp(NH)p imita los efectos estimuladores de GTP y lo hace de manera más eficiente. Rodbell y sus colegas observaron que Gpp(NH)p provoca notable estimulación de la actividad adenililciclase en membranas aisladas de diferentes células eucariotas, cualquiera que sea la naturaleza de los receptores acoplados a estos sistemas. Más aún, el análogo GTP no hidrolizable fue capaz de activar la adenililciclase incluso en ausencia de hormonas.⁵ Puesto que GTP inhibe de manera competitiva la activación de adenililciclase por Gpp(NH)p, se supone que actúan sobre el mismo sitio regulador. Estos resultados indican que el enlace de GTP, y no su hidrólisis, desempeña un papel importante en la activación de la estimulación mediada por hormona de la formación de AMP cíclico. La principal diferencia entre las actividades de GTP y sus análogos GTP no hidrolizables es que el primero estimula la adenililciclase de manera transitoria, en tanto que los últimos estimulan la actividad por un periodo prolongado. Estos datos condujeron a los investigadores a enfocarse en el mecanismo para la hidrólisis normal de GTP en el sistema adenililciclase.

A mediados de los años 1970, varios laboratorios, incluyendo el de Rodbell, identificaron una GTPasa localizada en las membranas plasmáticas de diferentes células. En un estudio clave, Don Cassel y Zvi Selinger, de la Universidad Hebrea

de Jerusalén, encontraron que la adición de isoproterenol (una hormona catecolamina similar a epinefrina) a un sistema para ensayar GTPasa de la membrana plasmática provocó incremento de 30 a 70% en la hidrólisis de ^{32}P -GTP estimado por la liberación de $^{32}\text{P}_i$ (fig. VE 15-4).⁶ La estimulación de la actividad GTPasa por la catecolamina fue independiente de la actividad adenililciclase. Esta conclusión se basa en el hecho de que: 1) la adición de AMPc en el ensayo de GTPasa no tiene efecto sobre la tasa de hidrólisis de GTP, y 2) el tratamiento de la membrana con N-etilmaleimida, un compuesto que inactiva ciertas proteínas atacando sus grupos sulfidrílo (-SH), provocó 98% de inhibición de adenililciclase pero no tuvo efecto sobre la hidrólisis de GTP estimulada por catecolamina. Todavía no se sabe si las actividades de GTPasa y de adenililciclase residen en la misma proteína o en dos proteínas separadas. De cualquier manera, Cassel y Selinger propusieron que la hidrólisis de GTP por la GTPasa sirve para desactivar la adenililciclase activada y retornar la enzima al estado basal inactivo.

En un estudio subsecuente, estos mismos investigadores demostraron que la activación del receptor por enlace de la hormona provoca la liberación de GDP enlazado formado por hidrólisis en intercambio de GTP que entra al sitio de enlace del nucleótido de guanilo de la proteína reguladora.⁷ Esta función de intercambio fue demostrada al incubar preparaciones de membranas de eritrocitos de pavo con una hormona de catecolaminas además de ^3H -GTP, lavado de las membranas y luego incubación de la preparación con más hormona. En estas condiciones, la hormona indujo la liberación de casi 25% del nucleótido radiactivo enlazado a la membrana. El análisis

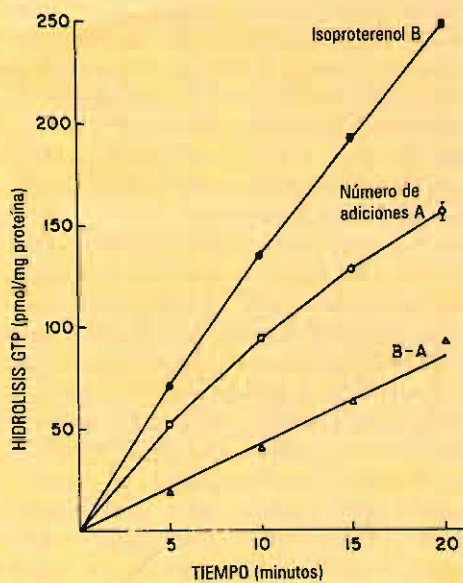


FIGURA VE 15-4. Curso temporal de la hidrólisis de GTP en presencia y en ausencia de la catecolamina isoproterenol por membranas de eritrocitos aisladas de pavo. El efecto de la hormona se observa en la curva inferior, en la cual se grafica la diferencia en la hidrólisis de GTP entre las preparaciones tratadas con hormona y las preparaciones testigo. (Según D. Cassel y Z. Selinger, *Bioc. Biop. Acta* 452:543, 1976.)

del nucleótido liberado por la hormona indicó que era ^3H -GDP. Estos estudios sugirieron que, en presencia de la hormona, el GTP se enlazaba inicialmente por el sitio de enlace del nucleótido de guanilo y luego era hidrolizado por actividad GTPasa con la liberación subsecuente del producto GDP. La liberación de GDP inducida por la hormona se estimula por la presencia de concentraciones bajas de GTP, lo que sugiere que el nucleótido liberado por la hormona es reemplazado de manera concurrente por el nucleótido de guanilo presente en el medio. Según estos resultados, se propuso que la reacción GTPasa en el sitio de enlace de nucleótido de guanil (conocido como sitio regulador) produce un GDP fuertemente enlazado que inactiva la adenililciclase. El enlace de una molécula de hormona al receptor desencadena un cambio de conformación en el sitio nucleótido de guanilo, lo que permite su acceso al medio que lo rodea (fig. 15-12). Puesto que las células mantienen una concentración mucho más alta de GTP en comparación con GDP, el acceso al sitio de enlace del nucleótido favorece que una molécula de GTP desplace al GDP enlazado, provocando la activación transitoria de la actividad adenililciclase.

Los resultados de los diferentes experimentos que acabamos de describir demuestran la existencia de un componente regulador del sistema hormona-adenililciclase activado por el enlace de GTP y desactivado por la hidrólisis de GTP. Se ha vuelto la atención a otras preguntas. La proteína enlazada a GTP, como se le llama, ¿es parte integral de la adenililciclase o un elemento separado? Si la proteína enlazada a GTP es un elemento separado, ¿cuál es su estructura y de qué manera interactúa con los otros elementos principales del sistema, el receptor y la adenililciclase? Para tomar el camino que conduce a responder estas cuestiones se requiere una breve disgresión.

El cólera es una enfermedad causada por una toxina bacteriana que provoca diarrea excesiva acompañada de pérdida de agua en los individuos afectados. A principios del decenio de 1970, varios laboratorios determinaron que la toxina del cólera actúa estimulando la adenililciclase en las células del epitelio intestinal. Experimentos subsecuentes revelaron que el efecto de la toxina no se confina a las células intestinales, sino que es eficaz para evocar varias respuestas mediadas por la estimulación hormonal de la adenililciclase. Se hizo evidente que la toxina del cólera imitara la acción de las hormonas al actuar sobre uno de los elementos comúnmente presentes en el sistema adenililciclase. En 1977, Cassel y Selinger demostraron que la toxina actúa inhibiendo la actividad GTPasa de la membrana, que equivale al efecto de mantener la adenililciclase en estado de estimulación prolongada (fig. VE 15-5).⁸ Esta observación demostró ser una de las claves para purificar la proteína enlazada a GTP.

La coenzima NAD^+ está formada por un grupo ADP-ribosa unido a una fracción nicotinamida (fig. 3-26). La toxina del cólera inactiva a la proteína enlazada a GTP transfiriéndole un grupo ADP-ribosa desde el NAD^+ a la proteína, reacción conocida como ADP-ribosilación. Se observó que cuando las membranas plasmáticas de los eritrocitos de pichón se incuban con la toxina del cólera en presencia de NAD^+ marcado con ^{32}P , la radiactividad se transfiere desde el NAD^+ a una proteína de membrana que tiene un peso molecular de 42 kD determinado por electroforesis en gel de poliácridamida con

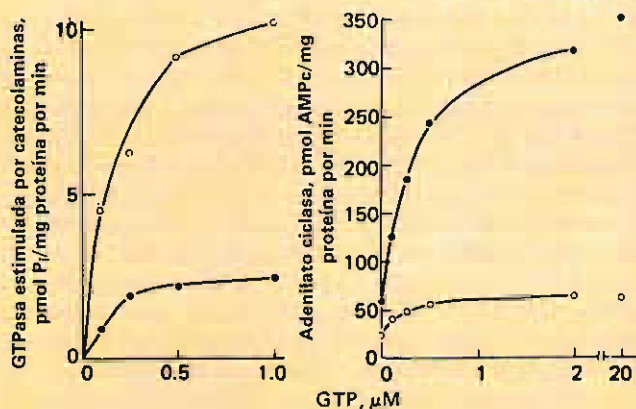


FIGURA VE 15-5. Efecto de la toxina del cólera sobre las actividades de catecolamina estimulada por GTPasa (izquierda) y adenililciclase (derecha) con diferentes concentraciones de GTP. Las membranas tratadas previamente en ausencia (círculos abiertos) o presencia (círculos cerrados) de toxina se ensayaron para actividad GTPasa y adenililciclase a las concentraciones indicadas de GTP. (Según D. Cassel y Z. Selinger, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:3309, 1977.)

dodecilsulfato de sodio (EGPA-DSS).⁹ Un estudio similar efectuado por otro grupo de investigadores demostró que cuando menos dos proteínas, de 45 kD y de 52 a 53 kD, eran ADP ribosilado por la toxina del cólera cuando se ensayaron en una estirpe de células cultivadas de linfoma de ratón (llamadas células S49).¹⁰ Se emplearon estas células en particular porque se disponía de una estirpe mutante de ellas incapaz de producir AMPc en respuesta a diferentes hormonas que de otro modo habrían provocado dicha respuesta. Esta variante de la estirpe celular, conocida como *cyc*⁻, posee adenililciclase activable, pero al parecer carece de algún otro componente necesario para la respuesta hormonal. Cuando se incubaron células *cyc*⁻ con toxinas del cólera en presencia de ³²P-NAD⁺, las bandas marcadas por células nativas estaban ausentes o muy reducidas. Estos resultados confirman fuertemente la idea de que: 1) los elementos reguladores del sistema de respuesta a adenililciclase son física y genéticamente separables de la propia adenililciclase, y 2) uno o más de estos elementos reguladores separables (como parte de la proteína enlazada a GTP) es un sustrato de la toxina del cólera.

En 1980, Alfred Gilman y sus colaboradores, de la Universidad de Virginia, lograron purificar la proteína enlazada a GTP luego de varios años de trabajo preliminar. La purificación se logró extrayendo proteínas de membranas plasmáticas de hígado en detergente y sometiendo la mezcla a seis procedimientos cromatográficos sucesivos (cuadro VE 15-2).¹¹ Igual que en cualquier procedimiento de purificación se requirió un ensayo para identificar la proteína buscada en las diferentes fracciones generadas por cada uno de los procedimientos cromatográficos. El ensayo para la proteína enlazada a GTP (o G/F, como se le denominó en este estudio) se basó en la observación justamente descrita de que las células mutantes S49 *cyc*⁻ del linfoma carecen de esta proteína reguladora clave y por lo tanto no responden a la estimulación hormonal. La adición de fracciones purificadas de la proteína enlazada a GTP a

CUADRO VE 15-2. Purificación del elemento regulador (G/F) de la adenililciclase del hígado de conejo*

Paso	Proteína (mg)	Unidades total (nmol/min)	Recuperación (%)	Actividad específica (nmol min ⁻¹ · mg)
Extracto de colato de membranas	2 020	4 380	100	2.2
DEAE-sefacel	114	2 930	67	26
Ultrogel AcA34	9.8	1 820	42	190
Heptilamina-sefarosa	0.70	740	17	1 060
Hidroxiapatita	0.30	350	8.0	1 200
GTP-sefarosa	0.18	290	6.6	1 600
DEAE-sefacel	0.039	150	3.5	3 800

* Se extrajeron membranas plasmáticas de hígado de conejo (8.6 g de proteína) y se purificaron. La actividad se midió mediante reconstitución de la actividad de adenililciclase activada por fluoruro en membrana *cyc*⁻. La actividad específica se define como la cantidad de actividad reconstituida por cantidad de G/F añadida a la mezcla de reconstitución. Las recuperaciones son acumulativas a través de la preparación.

FUENTE: J.K. Northup y cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:6518, 1980.

membranas plasmáticas aisladas de células *cyc*⁻ restituyó a las preparaciones su capacidad de responder a los estímulos (en este caso iones fluoruro, que imitan la acción de GTP) por activación de la adenililciclase. La actividad específica de la proteína enlazada a GTP en cada paso de la purificación (cuadro VE 15-2) se define como la cantidad de actividad de adenililciclase restituida observada por cantidad de proteína añadida a las membranas. Como se indica en el cuadro, la actividad específica del extracto de detergente incrementa aproximadamente 2 000 veces durante el procedimiento de purificación, que corresponde a una purificación de 5 000 a 10 000 veces de las membranas plasmáticas, o casi 100 000 veces de la proteína celular total.

Cuando la proteína purificada enlazada a GTP se sometió a EGPA-DSS, se observó la presencia de tres polipéptidos distintos (pesos moleculares de 52, 45 y 35 kD), lo que indica que la proteína reguladora es un complejo de múltiples subunidades. De los tres polipéptidos identificados en el estudio inicial, el polipéptido de 52 kD estaba presente en cantidades mucho más pequeñas y más variables y finalmente se observó que no era un miembro de la proteína enlazada a GTP. El polipéptido de 45 kD se conoció como subunidad α y el polipéptido de 35 kD como subunidad β . Posteriormente se descubrió un tercer polipéptido de 9 kD. De las tres subunidades, se demostró que la subunidad α de 45 kD es el polipéptido que contiene el sitio de enlace del GTP y también es el polipéptido ADP-ribosilado por la toxina del cólera.

Conforme se efectuaban estos estudios, en el laboratorio de Gilman se siguió otra línea de investigación enfocada sobre una proteína que inhibe la adenililciclase mediante un proceso dependiente de GTP. Se observó que la proteína inhibidora es inactivada por una toxina (llamada IAP) producida por la bac-

teria (*Bordetella pertussis*) que causa la tos ferina. Cuando las preparaciones plasmáticas de ciertas células que muestran control inhibitorio sobre adenililciclase se tratan con la toxina IAP purificada, se incrementa la actividad de adenililciclase, sugiriendo que la toxina inactiva al inhibidor. Estudios adicionales indicaron que la toxina IAP puede inactivar al inhibidor dependiente de GTP por la misma reacción (ribosilación de ADP) empleada por la toxina del cólera para inactivar la proteína estimuladora enlazada a GTP. Cuando se incubaron membranas plasmáticas de hígado con la toxina IAP en presencia de ^{32}P -NAD $^{+}$, se encontró que la radiactividad se transfiere a una proteína compuesta de dos subunidades con pesos moleculares de 41 kD y 35 kD.¹² De las dos subunidades, el polipéptido de 41 kD es el sustrato aparente de la toxina. Ninguno de estos polipéptidos fue marcado por la toxina del cólera. Datos adicionales indican que el polipéptido de 41 kD contiene un sitio de enlace para GTP. Luego de incubación con un análogo GTP hidrolizable, la proteína inhibidora enlazada a GTP (mencionada en esas publicaciones como sustrato IAP) se disocia en sus dos subunidades de manera análoga a como lo hace la proteína estimuladora enlazada a GTP (mencionada como G/F). Estos resultados apuntan a una fuerte homología entre G/F y el sustrato IAP. Ambas proteínas fueron purificadas siguiendo los mismos pasos; ambas respondieron de manera similar a los análogos GTP no hidrolizables y la activación por fluoruro; las subunidades más grandes de ambas proteínas (45 kD para G/F y 41 kD para IAP) contienen sitios para la ribosilación de ADP por toxinas específicas y sitios de enlace para GTP; y las subunidades menores de 35 kD fueron indistinguibles. Estos investigadores concluyeron con la afirmación: "Es posible que la actividad catalítica de [adenililciclase] sea modulada de manera recíproca por un par de homólogos de proteínas reguladoras enlazadas a GTP, G/F (G_s) y el sustrato IAP (G_i). Además, es intrigante el hecho de que la transducina, una proteína reguladora enlazada al nucleótido guanina del segmento más externo de los bastones [de la retina] que interactúa con una fosfodiesterasa GMP cíclica activada por luz, muestre notables semejanzas estructurales funcio-

nales. Una interesante familia de proteínas que parece estar surgiendo."

BIBLIOGRAFIA

1. Robison, G.A., Butcher, R.W. y Sutherland, E.W. 1969. Cyclic AMP. *Ann. Rev. Biochem.* 37:149-174.
2. Birnbaumer, L. y Rodbell, M. 1969. Adenyl cyclase in fat cells. II. Hormone receptors. *J. Biol. Chem.* 244:3477-3482.
3. Rodbell, M. y cols. 1971. The glucagon-sensitive adenyl-cyclase system in plasma membranes of rat liver. IV. Effects of guanyl nucleotides on binding of ^{125}I -glucagon. *J. Biol. Chem.* 246:1872-1876.
4. Rodbell, M. y cols. 1971. The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V. An obligatory role of guanyl nucleotides in glucagon action. *J. Biol. Chem.* 246:1877-1882.
5. Londos, C. y cols. 1974. 5'-Guanylylimidodiphosphate, a potent activator of adenylate cyclase systems in eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71:3087-3090.
6. Cassel, D. y Selinger, Z. 1976. Catecholamine-stimulated GTPase activity in turkey erythrocyte membranes. *Biochem. Biophys. Acta* 452:538-551.
7. Cassel, D. y Selinger, Z. 1978. Mechanism of adenylate cyclase activation through the β -adrenergic receptor: Catecholamine-induced displacement of bound GDP by GTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:4155-4159.
8. Cassel, D. y Selinger, Z. 1977. Mechanism of adenylate cyclase activation by cholera toxin: Inhibition of GTP hydrolysis at the regulatory site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:3307-3311.
9. Gill, D.M. y Meren, R. 1978. ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: basis of the activation of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3050-3054.
10. Johnson, G.L., Kaslow, H.R. y Bourne, H.R. 1978. Genetic evidence that cholera toxin substrates are regulatory components of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 253:7120-7123.
11. Northup, J. y cols. 1980. Purification of the regulatory component of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:6516-6520.
12. Bokoch, G.M. y cols. 1983. Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. *J. Biol. Chem.* 258:2072-2075.

SINOPSIS

La transmisión de señales en una célula es un fenómeno mediante el cual se transmite información a través de la membrana plasmática al interior de la célula y con frecuencia al núcleo celular. La emisión de señales celulares típicamente incluye reconocimiento del estímulo en la superficie externa de la membrana plasmática; transferencia de la señal a través de la membrana plasmática, y transmisión de la señal al interior de la célula, desencadenando una respuesta. Las respuestas pueden incluir cambio en la expresión de genes, alteración de la actividad de enzimas metabólicas, reconfiguración del citoesqueleto, cambio de la permeabilidad a iones, activación de la síntesis del DNA, o la muerte de la célula. Con frecuencia este proceso se denomina transducción de señal, puesto que el estímulo recibido en la superficie de la célula es totalmente diferente de la señal liberada en el interior de la

misma. Dentro de la célula, la información pasa lo largo de vías para transducción de señales, que con frecuencia incluyen varias proteincinasas y proteinfosfatasa capaces de activar o inhibir sus sustratos mediante cambios de conformación. Otra característica prominente de las vías para emisión de señales es el uso de las proteínas enlazadas a GTP que sirven como interruptores para activar o desactivar las actividades. La información no siempre se transmite desde el espacio extracelular al interior de la célula mediante un receptor en la superficie celular; hormonas esteroideas y óxido nítrico, por ejemplo, difunden a través de la membrana celular y actúan directamente en el interior de la célula (p. 628).

Muchos estímulos extracelulares (primeros mensajeros) inician sus respuestas interactuando con un receptor acoplado a

proteína G sobre la superficie externa de la célula y provocando la liberación de un segundo mensajero dentro de la misma. La captación y aprovechamiento de la glucosa son controlados por este tipo de vías para emisión de señales. La desintegración del glucógeno en glucosa es estimulada por las hormonas epinefrina y glucagon, que actúan como primeros mensajeros al enlazarse a sus respectivos receptores sobre la superficie externa de células específicas. El enlace de las hormonas activa un efector, adenililciclase, en la superficie externa de la membrana, lo que conduce a la producción de un segundo mensajero difusible, el AMP cíclico (AMPc). El AMP cíclico induce su respuesta a través de una reacción en cascada en la cual se modifican una serie de enzimas por enlaces covalentes. Las moléculas de AMP cíclico se enlazan al sitio regulador de una proteincinasa dependiente de AMPc denominada PKA, la cual fosforila fosforilasa cinasa y glucógeno sintasa, activando a la primera enzima e inhibiendo a la última. Las moléculas activadas de fosforilasa cinasa añaden fosfatos a la glucógeno fosforilasa, activando a esta última enzima, lo que conduce a desintegración del glucógeno para formar glucosa fosfato, que se convierte a glucosa. Como resultado de esta reacción en cascada, el mensaje original, entregado por enlace de la hormona en la superficie celular, se amplifica extensamente y se reduce mucho el tiempo de respuesta. Otra ventaja de este tipo de reacción en cascada es la posibilidad de regulación en diferentes sitios. La alteración de las funciones de la proteína como resultado de adición de grupos fosfato por las cinasas es revertida por fosfatasa que eliminan los fosfatos. El AMP cíclico se introduce en muchas células diferentes como respuesta a una gran variedad de primeros mensajeros. El curso de acontecimientos en la célula efectora depende de las proteínas específicas fosforiladas por la cinasa dependiente de AMPc (p. 631).

Tanto glucagon como epinefrina, y también muchos otros primeros mensajeros, actúan por enlace a receptores que son proteínas integrales de membrana que contiene siete hélices α que atraviesan la membrana. La señal se transmite desde el receptor al efector por medio de una proteína G enterotrimérica. Estas proteínas se conocen como enterotriméricas porque tienen tres subunidades (α , β y γ) y como proteína G porque se une a nucleótidos de guanina, sea GDP o GTP. Cada proteína G puede existir en dos estados: uno activo con una GTP enlazada o un estado activo con GDP enlazado. Se han identificado más de 100 diferentes receptores acoplados a proteína G que responden a una gran variedad de estímulos diferentes. Todos estos receptores actúan a través de un mecanismo similar. El enlace del ligando a su receptor específico provoca un cambio de conformación del receptor que incrementa su actividad por la proteína G. Como resultado, el receptor enlazado al ligando se enlaza a la proteína G, a continuación la proteína G libera su GDP enlazado y se enlaza a un sustituto GTP, que activa a la proteína G. El intercambio de nucleótidos de guanina modifica la conformación de la subunidad G_α , que se disocia de las otras dos subunidades, las cuales permanecen juntas como un complejo $G_{\beta\gamma}$. Cada subunidad G_α disociada con su GTP fijo puede activar moléculasceptoras específicas, como adenililciclase. La subunidad G_α disociada también es una GTPasa que actúa para hidrolizar GTP enlazado y formar GDP enlazado, que suprime la capaci-

dad de la subunidad para activar moléculas efectoras adicionales. El complejo G_α -GDP se asocia de nuevo con las subunidades $G_{\beta\gamma}$ para reconstituir el complejo trimérico y retornar el sistema a su estado de reposo. Cada una de las tres subunidades que constituyen una proteína G enterotrimérica pueden existir en diversas isoformas. Diferentes combinaciones de subunidades específicas sirven para construir proteínas G con propiedades diferentes en sus interacciones con receptores y efectores (p. 634).

La fosfolipasa C es otro efector importante situado en la superficie interna de la membrana plasmática que puede ser activada por proteínas G enterotriméricas. La fosfolipasa C actúa para separar el 4,5-difosfato de fosfatidilinositol (PIP_2) en dos segundos mensajeros diferentes, 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP_3) y 1,2-diacylglicerol (DAG). El DAG permanece en la membrana plasmática donde activa a la enzima proteincinasa C, que fosforila residuos de serina y treonina sobre varias proteínas específicas, incluyendo enzimas del metabolismo intermedio, como la glucógeno sintasa, y factores de transcripción, como la miogenina. La activación constitutiva de la proteincinasa C conduce a pérdida del control del crecimiento. El IP_3 es una molécula pequeña hidrosoluble que puede difundir hacia el citoplasma, donde se enlaza a receptores IP_3 localizados en la superficie del RE liso. Los receptores IP_3 son canales tetraméricos para el ion calcio; su enlace con IP_3 abre el canal iónico y libera Ca^{2+} en el citoplasma (p. 639).

La rápida elevación del Ca^{2+} citoplásmico, sea provocado por la abertura de los canales iónicos en la membrana citoplásmica o de canales iónicos en la membrana plasmática, desencadena una gran variedad de respuestas celulares. La concentración de Ca^{2+} normalmente se conserva a 10^{-7} M, aproximadamente, dentro del citoplasma por acción de bombas de Ca^{2+} localizadas en la membrana plasmática y en el RE liso. Muchos estímulos diferentes, que van desde el espermatozoide fertilizante hasta la llegada de un impulso nervioso en la célula muscular, provocan elevación súbita del $[Ca^{2+}]$ citoplásmico, que puede ocurrir después de la abertura de los canales del Ca^{2+} en la membrana plasmática, receptores de IP_3 , o receptores de rianodina, que son un tipo diferente de receptor-canal de calcio localizado en la membrana del retículo endoplásmico liso. Según el tipo de célula, los canales de rianodina pueden abrirse por un potencial de acción que llega a la célula, por la síntesis del segundo mensajero ribosa de difosfato de adenosina cíclica (ADPRc), o por el flujo hacia adentro de una pequeña cantidad de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática. Entre las respuestas, el $[Ca^{2+}]$ elevado puede activar o inhibir varias enzimas y sistemas de transporte, provocar fusión de la membrana o alteraciones en el citoesqueleto, o funciones contráctiles. El calcio no actúa sobre estos diferentes efectores en su estado iónico libre, sino que se enlaza a algunas de las escasas proteínas enlazadas a calcio, que a su vez despiertan la respuesta. La más ampliamente difundida de estas proteínas es la calmodulina, que contiene cuatro sitios para enlazar calcio. El ion calcio es un segundo mensajero particularmente importante en células vegetales, donde es mediador de la respuesta a varios estímulos, incluyendo cambios en la luz, presión, gravedad y concentración de hormonas vegetales, como el ácido abscísico (p. 641).

Muchos estímulos extracelulares inician una respuesta celular porque se enlazan al dominio extracelular de un receptor de tirosincinasa (RTK), que inicia la actividad de tirosincinasa de la proteína localizada en la superficie interna de la membrana plasmática. La insulina inicia muchas de sus acciones sobre células receptoras mediante interacción con el receptor de insulina, que es un RTK. La cinasa activada añade grupos fosfato a residuos de tirosina localizadas en el receptor y en sustratos selectivos (SRI). Los SRI fosforilados entonces pueden enlazarse y activar a varios efectores por delante de la vía. Los residuos de tirosina fosforilados en un SRI sirven como "atracaaderos" para proteínas que poseen dominios SH2, las cuales se activan al enlazarse al SRI. Puesto que algunas proteínas diferentes que contienen dominios SH2 pueden enlazarse a SRI fosforilados, se pueden activar varias vías separadas para transmisión de señales. En tanto una vía pueda estimular la síntesis de DNA y la división de la célula, otra quizá estimule el movimiento de los transportadores de glucosa hacia la membrana celular, y otra más todavía pueda activar factores de transcripción que inicien la expresión de un grupo de genes específicos para insulina (p. 646).

Diversos agentes extracelulares interactúan con los RTK sobre la superficie de células efectoras específicas y regulan diversas funciones, incluyendo crecimiento y proliferación celular, el curso de la diferenciación celular, la captación de partículas extrañas y la supervivencia de la célula. Los ligandos estimuladores del crecimiento mejor estudiados, como FCDP, FCE y FCF, activan la vía de transmisión de señales denominada cascada cPAM, que incluye una pequeña proteína monomérica enlazada a GTP llamada Ras. Igual que otras proteínas G, Ras oscila entre una forma inactiva enlazada a GDP y una forma activa enlazada a GTP. En su forma activa, Ras estimula efectores situados hacia adelante en la vía de emisión de señales. Igual que otras proteínas G, Ras tiene una actividad GTPasa intrínseca que hidroliza al GTP enlazado para formar GDP enlazado, modificando a sí misma su estado para desactivarse. Cuando un ligando se enlaza a RTK, la autofosforilación del dominio citoplásmico del receptor conduce al reclutamiento de Ras en la superficie interna de la membrana y al intercambio de GDP enlazado por un GTP, activando así la proteína G. El Ras activado tiene mayor afinidad por otra proteína denominada Raf, reclutada en la membrana plasmática donde se convierte en una proteincinasa activa que inicia una cadena ordenada de reacciones de fosforilación, delineadas en la figura 15-27. Los efectores finales de la cascada cPAM son los factores de transcripción que estimulan la expresión de genes cuyos productos desempeñan un papel clave en la activación del ciclo celular que conduce al inicio de

la síntesis de DNA y división de la célula. La cascada cPAM también estimula la síntesis de proteínas liberando la inhibición ejercida por una proteína citoplásmica llamada PHAS-1 que se enlaza a uno de los factores clave de inicio (eIF4E). La cascada cPAM se observa en todos los eucariotes, desde levaduras hasta mamíferos, aunque ha sido adaptada por la evolución para despertar muchas respuestas diferentes en distintos tipos de células (p. 648).

Diferentes sistemas para emisión de señales a menudo se interconectan de modo que las señales de varios ligandos no relacionados puedan convergir para activar un efector común, como Ras; las señales del mismo ligando pueden divergir para activar a varios efectores, y se pueden pasar señales hacia atrás y hacia adelante entre distintas vías (interferencia). La convergencia entre vías para emisión de señales se ilustra por el enlace de FCE, FCDP e insulina, todos los cuales activan Ras y la cascada cPAM. La divergencia también se ilustra con estos mismos ligandos, los cuales después de enlazarse a sus respectivos RTK pueden activar varias vías además de la cascada de proteincinasa activada por mitógeno. Las vías estimuladas por AMPc y Ca^{2+} participan en la interferencia ejemplificada por la capacidad de los iones calcio para activar adenilciclase y por la proteincinasa dependiente de AMPc (PKA) para fosforilar canales del ion Ca^{2+} (p. 651).

El óxido nítrico (NO) actúa como mensajero intercelular capaz de difundir directamente a través de la membrana plasmática de la célula efectora. Entre las actividades estimuladas por NO se incluyen la fagocitosis por macrófagos, relajación de las células de músculo liso que reviste los vasos sanguíneos, y la contracción peristáltica del músculo liso del intestino. El NO se produce por acción de la enzima sintasa de óxido nítrico, que usa arginina como sustrato. NO actúa activando la guanilil ciclase para producir el segundo mensajero GMPc (p. 656).

Las vías para emisión de señales pueden terminar en apoptosis: muerte programada de la célula. Ejemplos de apoptosis incluyen la muerte del exceso de células nerviosas, muerte de tejido embrionario no deseado, muerte de linfocitos T capaces de reaccionar contra los propios tejidos del cuerpo y la muerte de células potencialmente cancerosas. La muerte por apoptosis se caracteriza por compactación total de la célula y su núcleo y la disección ordenada de la cromatina por endonucleasas especiales. Al parecer, la apoptosis es mediada principalmente por la liberación de Ca^{2+} y la activación de ciertas proteincinasas, y requiere la activación de un grupo específico de genes (p. 658).

PREGUNTAS DE REPASO

1. Describir, en términos generales, los pasos que ocurren durante la emisión de señales celulares desde la secreción de un factor de crecimiento u hormona por un tejido hasta la respuesta por una célula efectora.
2. ¿Qué se entiende con el término *transducción de señal* y por qué se utiliza?
3. ¿En qué se parece una vía para emisión de señales, como la cascada cPAM, a un sistema de transporte de electrones? ¿En qué es diferente?
4. En la figura 15-2, el último elemento de la vía es un factor de transcripción. Describir los pasos de una vía en la cual sea fosforilado un factor de transcripción.

- ¿Cómo es posible que el mismo primer mensajero, como la epinefrina, pueda inducir respuestas diferentes en distintas células efectoras? ¿Que el mismo segundo mensajero, como AMPc, pueda también evocar respuestas diferentes en distintas células efectoras? ¿Que la misma respuesta, como la desintegración de glucógeno, se pueda iniciar por diferentes estímulos?
- Describir los pasos que conducen desde la síntesis del AMPc en la superficie interna de la membrana plasmática de una celdilla hepática hasta la liberación de glucosa en el torrente sanguíneo. ¿Cómo se puede controlar este proceso mediante inhibidores enzimáticos, como el inhibidor-1? ¿Mediante proteínofosfatasa? ¿Mediante AMPc fosfodiesterasa?
- ¿Qué se entiende por el término *amplificación* en relación con la transducción de señales? ¿De qué manera el uso de una reacción en cascada produce una amplificación de la señal? ¿Cómo incrementa las posibilidades de regulación metabólica?
- Describir los pasos que ocurren entre el enlace de un ligando, como glucagon, a un receptor de siete hélices y la activación de un efector, como la adenililciclase. ¿De qué manera se atenúa normalmente la respuesta?
- ¿Qué determina si un estímulo que actúa a través de una proteína G heterotrímica será estimulador o inhibidor para un efector?
- Mencione dos estímulos extracelulares que conduzcan a la formación de IP_3 . ¿Cuál es el mecanismo de formación de este segundo mensajero? ¿Cuál es la relación entre la formación de IP_3 y la elevación de $[Ca^{2+}]$ intracelular?
- Describir la relación entre fosfatidilinositol, diacilglicerol, iones calcio y proteincinasa C. ¿De qué manera interfieren los ésteres de forbol con las vías para emisión de señales en las cuales participa diacilglicerol?
- Describir el papel del calcio en la mediación del diámetro de los estomas por las células guardianes.
- Describir los pasos entre el enlace y una molécula de insulina en la superficie de una célula específica y la activación del efector $PI(3)K$. ¿En qué difiere la acción de la insulina de los otros ligandos que actúan por medio de un receptor de tirosincinasa?
- ¿Cuál es el papel de Ras en las vías para transducción de señales? ¿De qué manera promueve la divergencia y la convergencia en estas vías?
- ¿Cómo altera la cascada cPAM la actividad de transcripción y de traducción en una célula?
- Describir los pasos en la vía para emisión de señales mediante la cual el óxido nítrico media la dilatación de los vasos sanguíneos.

PREGUNTAS ANALÍTICAS

- Hicimos notar que el tema de la emisión de señales celulares se colocó casi al fin del libro porque está íntimamente vinculado con muchos temas diferentes en biología celular. Ahora que usted ha leído el capítulo, ¿estaría de acuerdo o en desacuerdo con esta afirmación? Apoye sus conclusiones con ejemplos.
- Supongamos que la vía de emisión de señales de la figura 15-2 conduce a la activación de un gen que inhibe una cinasa dependiente de ciclina. ¿Cómo afectaría una mutación debilitante en la fosfatasa-2 al crecimiento de la célula? ¿Cómo afectaría una mutación similar en la proteincinasa-3 al crecimiento de la célula?
- ¿Cuál sería el efecto sobre la función hepática de una mutación en un gen que codifica AMPc fosfodiesterasa? ¿De una mutación en un gen que codifica un receptor para glucagon? ¿De una mutación en un gen que codifica fosforilasa cinasa? ¿De una mutación que altere el sitio activo de la subunidad GTPasa de una G_{α} ?
- Ca^{2+} , IP_3 y AMPc son segundos mensajeros muy diferentes. ¿En qué se parecen sus mecanismos de acción? ¿En qué son diferentes?
- En la reacción en cascada ilustrada en la figura 15-27, ¿qué pasos conducen a la amplificación y cuáles no?
- Supongamos que la epinefrina y la norepinefrina pueden iniciar una respuesta similar en una célula efectora particular. ¿Cómo se podría demostrar que los dos compuestos actúan enlazándose al mismo receptor en la superficie de la célula?
- Uno de los experimentos claves para demostrar que las uniones de abertura (pág. 215) permiten el paso de moléculas pequeñas se llevó a cabo permitiendo que las células de músculo cardíaco (que responden a la norepinefrina contrayéndose) formen uniones de abertura con células de la granulosa ovárica (que responden a la FSH al ser sometidas a varios cambios metabólicos). A continuación los investigadores añadieron FSH a la mezcla del cultivo celular. ¿Qué resultados sería de esperar y cómo apoyan el papel de las uniones de abertura en la transmisión de señales entre las células?
- ¿Cómo afectaría un análogo de GTP no hidrolizable a los sucesos de emisión de señales que tienen lugar durante la estimulación de una célula hepática con glucagon? ¿Cuál sería el efecto del mismo análogo sobre la emisión de señales de una célula epitelial estimulada por el factor de crecimiento epidérmico, FCE? ¿Cómo se compararían los efectos de la toxina del cólera sobre estas mismas células?
- Se esperaría que la fosfatidilcolina pudiera servir como precursor para un segundo mensajero que desencadena la sección de una hormona en un tipo de célula endocrina cultivada que usted estaba estudiando. Además, se sospecharía que el segundo mensajero liberado por la membrana plasmática en respuesta a un estímulo fuera fosfato de colina. ¿Qué tipos de experimentos podrían efectuarse para verificar su hipótesis?
- La figura 15-16 muestra los cambios localizados en Ca^{2+} dentro de un macrófago durante la fagocitosis. Los iones

de calcio son agentes pequeños rápidamente difusibles. ¿Cómo una célula puede mantener concentraciones diferentes de este ion libre en diferentes regiones de su citoplasma? ¿Qué sospecharía usted que ocurriera si se inyecta un pequeño volumen de solución de cloruro de calcio en una célula inyectada previamente con una sonda de calcio fluorescente?

11. Formular una hipótesis para explicar de qué manera el contacto de un espermatozoide fertilizante sobre la superficie exterior de un óvulo en un sitio determinado puede provocar una onda de liberación de Ca^{2+} que se propaga a través de todo el óvulo, según se muestra en la figura 15-18.
12. Puesto que la calmodulina puede activar muchos efectores diferentes (p. ej., proteinquinasas, fosfodiesterasas, proteínas transportadoras de calcio), una molécula de calmodulina debe tener muchos sitios de enlace sobre su superficie. ¿Estaría usted de acuerdo con esta afirmación? ¿Por qué sí o por qué no?

13. La diabetes es una enfermedad que puede ser resultado de varios efectos, todos los cuales implican la función de la insulina. Describa tres diferentes anomalías moleculares en una célula hepática que podrían causar a diversos pacientes un cuadro clínico similar, incluyendo, por ejemplo, concentración elevada de glucosa en sangre y orina.
14. ¿Esperaría usted que una respuesta celular a FCE fuese más sensible a la fluidez de la membrana plasmática que su respuesta a insulina? ¿Por qué sí o por qué no?
15. ¿Esperaría usted que una mutación en Ras actuara de manera dominante o recesiva como causa de cáncer? ¿Por qué? (Una mutación dominante muestra su efecto cuando sólo uno de los alelos homólogos presenta la mutación, en tanto que una mutación recesiva requiere que ambos alelos del gen presenten la mutación.)
16. Especular acerca de un mecanismo mediante el cual la apoptosis pueda desempeñar un papel crucial para combatir el desarrollo del cáncer, tema analizado en el siguiente capítulo.

BIBLIOGRAFIA

Respuestas mediadas por proteína G heterotrimérica

- Bourne, H.R. 1992. The target sets the tempo. *Nature* 358:541-543.
- Clapham, D.E. y Neer, E.J. 1993. New roles for G-protein $\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signaling. *Nature* 365:403-406.
- Cohen, P. 1988. Protein phosphorylation and hormone action. *Proc. Roy. Acad. Sci. Lon.* B234:115-144.
- Cooper, D.M.F. y cols. 1995. Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signaling. *Nature* 374:421-434.
- Dohlman, H.G. y cols. 1991. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 60:653-688.
- Goody, R.S. 1994. How G proteins turn off. *Nature* 372:220-221.
- Lefkowitz, R.J. 1992. The subunit story thickens. *Nature* 358:372.
- Neer, E.J. 1995. Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. *Cell* 80:249-257.
- Strader, C.D. y cols. 1994. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 63:101-132.
- Tang, W.-J. y Gilroy, A.G. 1992. Adenylyl cyclases. *Cell* 70:859-872.

La perspectiva humana

- Clapham, D.E. 1993. Mutations in G protein-linked receptors: Novel insights on disease. *Cell* 75:1237-1239.
- Clapham, D.E. 1994. Why testicles are cool. *Nature* 371:109-110.
- Kahn, C.R. 1995. Diabetes: Causes of insulin resistance. *Nature* 373:384-385.
- Lekfowitz, R.J. 1993. Turned on to ill effect. *Nature* 365:603-604.
- Nowak, R. 1994. Moving development research into the clinic. *Science* 266:567-568.

Respuestas mediadas por RTK

- Blumer, K.J. y Johnson, G.L. 1994. Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *Trends Biochem. Sci.* 19:236-240.
- Boudewijn, M. y cols. 1995. Regulation of Ras-mediated signaling: More than way to skin a cat. *Trends Biochem. Sci.* 20:18-22.
- Bourne, H.R. 1994. The importance of being GTP. *Nature* 369:611-612.
- Bourne, H.R. 1993. A turn-on and a surprise. *Nature* 366:628-629.

- Burgering, B.M.T. y Bos, J.L. 1995. Ras-mediated signaling: More than one way to skin a cat. *Trends Biochem. Sci.* 20:18-23.
- Chavrier, P. y cols. 1993. An immunologist's look at the Rho and Rab GTP-binding proteins. *Immunol. Today* 14:440-444.
- Cook, S. y McCormick, F. 1994. Ras blooms on sterile ground. *Nature* 369:361-362.
- Downward, J. 1992. Rac and Rho in time. *Nature* 359:273-274.
- Egan, S.E. y Weinberg, R.A. 1993. The pathway to signal achievement. *Nature* 365:781-783.
- Fantl, W.J. y cols. 1993. Signaling by receptor tyrosine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* 62:453-481.
- Feig, L.A. y Schaffhausen, B. 1994. The hunt for Ras targets. *Nature* 370:508-509.
- Hall, A. 1994. A biochemical function for Ras—at last. *Science* 264:1413-1414.
- Lienhard, G.E. 1994. Life without the IRS. *Nature* 372:128-129.
- Marshall, C.J. 1994. Hot lips and phosphorylation of protein kinases. *Nature* 367:686.
- Marx, J. 1993. Two major signal pathways linked. *Science* 262:988-989.
- Marx, J. 1993. Forging a path to nucleus. *Science* 260:1588-1590.
- McCormick, F. 1994. The Holy Grail of Ras biology. *Trends Cell Biol.* 4:347-350.
- Montminy, M. 1993. Trying on a new pair of SH2s. *Science* 261:1694-1695.
- Myers, M.G. y cols. 1994. The IRS-1 signaling system. *Trends Biochem. Sci.* 19:289-293.
- O'Brien, C. 1994. Missing link in insulin's pathway to protein production. *Science* 266:542-543.
- Pawson, T. 1995. Protein modules and signaling networks. *Nature* 373:573-580.
- Ruderman, J.V. 1993. MAP kinase and the activation of quiescent cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5:207-213.
- Schmidt, K. 1994. A puzzle: How similar signals yield different effects. *Science* 266:566-567.

Mensajeros lípidos y respuestas mediadas por calcio

- Berridge, M.J. 1993. Inositol triphosphates and calcium signaling. *Nature* 361:315-325.
- Brown, A.M. y Birnbaumer, L. 1990. Ionic channels and their regulation by G protein subunits. *Ann. Rev. Physiol.* 52:197-213.
- Cooper, D.M.F. y cols. 1995. Adenyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signaling. *Nature* 374:421-424.
- Galione, A. 1993. Cyclic ADP-ribose: A new way to control calcium. *Science* 259:325-326.
- Galione, A. y White, A. 1994. Ca^{2+} release induced by cyclic ADP-ribose. *Trends Cell Biol.* 4:431-436.
- Hurley, J.B. 1995. Signal transduction: Phospholipids in action. *Nature* 373:37-43.
- Irvine, R.F. 1992. Inositol phosphates and Ca^{2+} entry: Toward a proliferation or a simplification. *FASEB J.* 6:3085-3091.
- Kiley, S.C. y Jaken, S. 1994. Protein kinase C. *Trends Cell Biol.* 4:223-227.
- Liscovitch, M. y Cantley, L.C. 1994. Lipid second messengers. *Cell* 77:329-334.
- Majerus, P.W. 1992. Inositol phosphate biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* 61:225-250.
- McPherson, P.S. y Campbell, K.P. 1993. The ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channel. *J. Biol. Chem.* 268:13765-13768.
- Putney, J.W., Jr. 1993. Excitement about calcium signaling in inexcitable cells. *Science* 262:676-678.
- Roberts, M.F. 1994. First thoughts on lipid second messengers. *Trends Cell Biol.* 4:219-223.
- Torok, K. y Whitaker, M. 1994. Taking a long, hard look at calmodulin's warm embrace. *Bioess.* 16:221-224.

Emisión de señales en plantas

- Assmann, S.M. 1993. Signal transduction in guard cells. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9:345-375.

- Gilroy, S. y Trewavas, A. 1994. A decade of plant signals. *Bioess.* 16:677-682.

- Jones, A.M. 1994. Suppressing signals in plant cells. *Science* 263:183-184.

Diversos

- Bredt, D.S. y Snyder, S.H. 1994. Nitric oxide: A physiologic messenger molecule. *Ann. Rev. Biochem.* 63:175-195.
- Casey, P.J. y cols. 1995. Signal transduction. *Science* 268:221-255.
- Feramisco, J.R. y Watterson, D.M. eds. 1993. Cell regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:239-291.
- Hughes, D.A. 1994. Histidine kinases hog the limelight. *Nature* 369:187-188.
- Juliano, R.L. y Haskell, S. 1993. Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 120:577-585.
- Krebs, E.G. y cols. 1994. Protein phosphorylation. *Trends Biochem. Sci.* vol. 19, issue no. 11.
- Lee, S. y cols. 1993. Apoptosis and signal transduction: Clues to a molecular mechanism. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:286-291.
- Lowenstein, C.J. y Snyder, S.H. 1992. Nitric oxide: A novel biologic messenger. *Cell* 70:705-707.
- Marshall, C.J. y cols. 1995. Reviews on signal transduction. *Cell* 80:179-278.
- Nathan, C. y cols. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* 78:915-936.
- Schaller, M.D. y Parsons, J.T. 1993. Focal adhesion kinase: An integrin-linked protein tyrosine kinase. *Trends Cell Biol.* 3:258-262.
- Snyder, S.H. 1994. Nitric oxide: More jobs for that molecule. *Nature* 372:504-505.
- Takai, Y. y cols. 1995. Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem. Sci.* 20:227-231.

Cáncer

16-1 Biología del cáncer

16-2 Causas del cáncer

16-3 Genética del cáncer

La vía experimental: El descubrimiento de los oncogenes



FIGURA 16-A. Mamografía que muestra la presencia de un tumor. (VU/Visuals Unlimited.)

El cáncer es una enfermedad producida por cambios en la conducta de las células, provocada por modificaciones en la información genética subyacente de las mismas. Debido a estas alteraciones, las células cancerosas proliferan sin control formando tumores malignos que tienden a crecer de manera invasiva (fig. 16-1), destruyendo tejidos y órganos normales. En tanto el crecimiento del tumor permanezca localizado, la enfermedad de ordinario se puede tratar y curar por extirpación quirúrgica del tumor y el tejido que lo rodea. Sin embargo, una de las características prominentes de los tumores malignos es su tendencia a formar *metástasis*, o sea, células que se desprenden de la masa original entran a la circulación linfática o sanguínea y se propagan a sitios distantes en el cuerpo, donde establecen tumores secundarios (*metástasis*) que ya no son susceptibles de extirpación quirúrgica. Los cambios en la superficie celular que promueven la conducta metastática de las células cancerosas se analizan en *La perspectiva humana* del capítulo 7.

Debido a su impacto sobre la salud humana y a la esperanza de encontrar una curación, el cáncer ha sido foco de esfuerzos intensos de investigación durante decenios. Aunque estos estudios han conducido a un notable avance en el conocimiento de las bases celulares y moleculares del cáncer, prácticamente no tienen impacto en la prevención o el aumento de la tasa de supervivencia de personas afectadas con la *mayor parte* de los tipos de cáncer. En la figura 16-2 se muestra la tasa de ocurrencia de diferentes tipos de cáncer y la mortalidad consecuente en Estados Unidos. Los tratamientos actuales, como la quimioterapia y la radiación, son incapaces de destruir selectivamente a las células cancerosas sin dañar en forma simultánea a células normales, según puede juzgarse por los graves efectos colaterales que acompañan a estos tratamientos. Como resultado, los pacientes por lo general no se pueden someter a dosis suficientemente altas para destruir todas las células tumorales de su cuerpo.

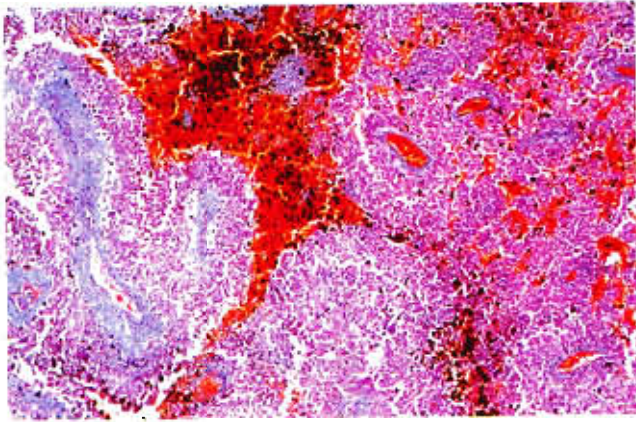


FIGURA 16-1. Invasión del tejido normal por un tumor en crecimiento. Esta micrografía de luz de un corte de hígado humano muestra metástasis de un melanosarcoma (en rojo) que invade el tejido hepático normal. (Micrografía por Astrid y Hanns-Frieder Michler/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc.)

Es difícil afirmar si esta situación puede cambiar en un futuro cercano. En la actualidad se han identificado muchos de los genes y productos de gen causantes de los cánceres humanos, y los investigadores tienen mejores objetivos que cumplir. La idea del tratamiento del cáncer mediante geneterapia se analizó en *La perspectiva humana* del capítulo 10 (pág. 423). Una curación basada en la geneterapia puede ser la mejor expectativa a largo plazo en la guerra contra el cáncer, pero los tratamientos de este tipo requieren que la mayor parte, si no es que todas, de las células tumorales se alteren genéticamente. En el momento actual, la modificación del genoma de miles de millones de células malignas enterradas profundamente en los tejidos del cuerpo todavía es un proyecto distante.

La mayor parte de los esfuerzos actuales para lograr tratamientos innovadores contra el cáncer se centran en los intentos de obtener que el sistema inmunológico participe de manera más activa en la lucha contra las células malignas. Hace diez o veinte años, aproximadamente, hubo gran optimismo por la posibilidad de inducir en el sistema inmunológico de una persona la capacidad para reconocer células cancerosas como cuerpos extraños y establecer un ataque

contra dichas células para destruir hasta la última de ellas. Gran parte de este optimismo se desvaneció en años recientes conforme se acumularon datos de que el sistema inmunológico no es tan eficiente para destruir células cancerosas, como alguna vez se pensó. Aunque en la actualidad se están planeando pruebas clínicas de numerosos agentes estimuladores inmunológicos o “vacunas contra el cáncer”, las expectativas alguna vez relacionadas con este tipo de ensayos clínicos han disminuido notablemente.

16-1 Biología del cáncer

Gran parte del conocimiento adquirido acerca de la conducta de células cancerosas humanas proviene de estudios en los cuales se cultivan células derivadas de un tumor. A nivel celular, la característica más importante de una célula cancerosa, ya sea que resida en el cuerpo o en un plato de cultivo, es la pérdida de control de su crecimiento. La capacidad de crecimiento y división no es tan diferente entre una célula cancerosa y la mayor parte de las células normales. Cuando estas últimas crecen en un cultivo de tejidos, bajo condiciones que favorecen la proliferación celular, se desarrollan y dividen a una velocidad similar a la de sus contrapartes malignas. Sin embargo, cuando las células normales proliferan hasta el punto de cubrir el fondo del plato de cultivo, su tasa de crecimiento disminuye notablemente y tienden a permanecer como una capa simple (*monocapa*) de células (fig. 16-3, *a,b*). La disminución de la tasa de crecimiento se debe a que las células responden a influencias inhibitorias de su ambiente. Estas influencias inhibitorias del crecimiento pueden surgir como resultado de depleción de factores del crecimiento en el medio de cultivo o de contacto con células circunvecinas en el plato de cultivo. En contraste, cuando se cultivan células malignas en las mismas condiciones, continúan creciendo, apilándose una encima de otra para formar grumos (fig. 16-3, *c,d*). Es evidente que las células malignas no responden a las influencias que causan el cese de crecimiento y división en sus contrapartes normales.

Esta misma falta de respuesta a señales externas es la razón de que las células cancerosas constituyan una amenaza dentro del cuerpo. El crecimiento incontrolado, combinado con la tendencia a producir metástasis, confiere a las células malignas su característica de amenaza mortal. Retornaremos

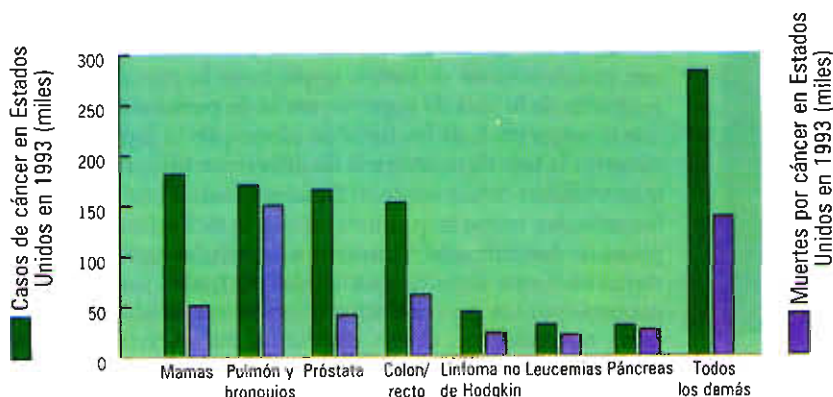
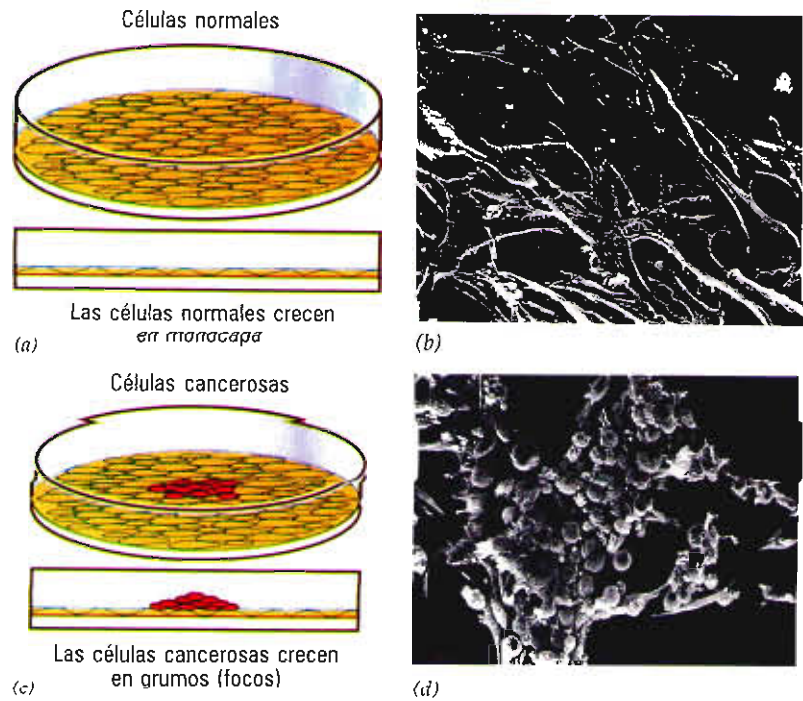


FIGURA 16-2. Incidencia de varios tipos de cáncer en Estados Unidos y número de muertes que causan por año. Tomado de los datos comunicados por el National Cancer Institute.

FIGURA 16-3. Propiedades del crecimiento de células normales y células cancerosas. Típicamente, las células normales crecen en un plato de cultivo hasta que cubren la superficie del plato como una monocapa (a y b). En contraste, las células transformadas por virus o carcinógenos químicos (o células malignas cultivadas a partir de tumores) de manera peculiar crecen formando grumos de múltiples capas, o focos (c y d). (b y d: Cortesía de G. Steven Martin.)



a los tipos de cambios celulares que sirven como marcas características de las células malignas, pero primero consideraremos algunas de las propiedades morfológicas y bioquímicas que distinguen a las células normales de las malignas.

Fenotipo de una célula cancerosa

Se han catalogado numerosas diferencias, tanto estructurales como bioquímicas, entre células normales y células cancerosas. Sin embargo, también hay muchas variables de un tipo de célula cancerosa a otra, haciendo imposible describir las propiedades de una célula cancerosa "típica". También resulta difícil afirmar cuáles, de todas las diferencias entre células normales y cancerosas, son la principal causa de que la célula se vuelva potencialmente una amenaza para la vida, y cuáles son las propiedades secundarias que resultan de los cambios primarios. La conducta de las células cancerosas es más fácil de estudiar cuando las células crecen en cultivo. Se pueden obtener células de este tipo extirpando un tumor maligno, disociando el tejido para separar las células y luego cultivando las células *in vitro*. Alternativamente, las células normales se pueden convertir en "células cancerosas" mediante tratamiento con un carcinógeno químico, radiaciones o un virus tumoral infeccioso. Las células así **transformadas** por sustancias químicas o virus en cultivo por lo general pueden formar un tumor cuando se introducen en un animal huésped apropiado.

Las alteraciones más notables después de la transformación ocurren en los cromosomas. En general, las células normales conservan su dotación cromosómica diploide normal conforme crecen y se dividen, tanto *in vivo* como *in vitro*. En contraste, las células cancerosas con frecuencia presentan

dotación cromosómica muy aberrante, alteración denominada **aneuploidía** (fig. 16-4). Estos cariotipos muy aberrantes al parecer son resultado de crecimiento anormal de las células cancerosas, más bien que una causa de las mismas. De todas maneras, es evidente que el crecimiento de las células cancerosas depende mucho menos de un contenido cromosómico normal en comparación con las células normales.

Los cambios morfológicos más notables que ocurren en el citoplasma casi siempre afectan al citoesqueleto. En tanto una célula normal por lo general contiene una red bien organizada de microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, el citoesqueleto de las células cancerosas a menudo está reducido, desorganizado, o ambas cosas (fig. 16-5). También se ha comunicado que ocurren numerosos cambios en la superficie celular, incluyendo la aparición (o incremento) y desaparición (o disminución) de componentes particulares. Algunas células cancerosas poseen nuevas proteínas en la superficie celular conocidas como **antígenos asociados al tumor** porque pueden inducir la formación de anticuerpos dirigidos contra las células. Debido a los cambios en la superficie celular, típicamente las células cancerosas son menos adherentes, tanto entre sí como a los sustratos no celulares. Se cree que esta pérdida de adhesividad se correlaciona con la capacidad de las células cancerosas para abandonar una masa tumoral y emigrar a otros sitios dentro del cuerpo. La disminución de las interacciones adhesivas entre células tumorales también se refleja en la reducción de su tendencia a formar uniones de abertura entre sí (pág. 271).

También se puede distinguir a las células cancerosas de las normales por su movilidad en cultivo. Como se hizo notar en el capítulo 9, la membrana de una célula normal, cuando entra en contacto con otra célula, cesa su actividad y

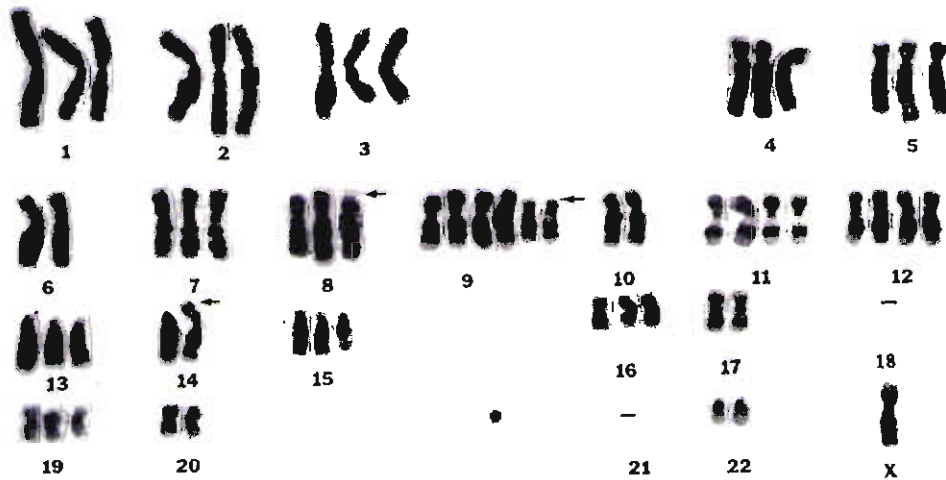
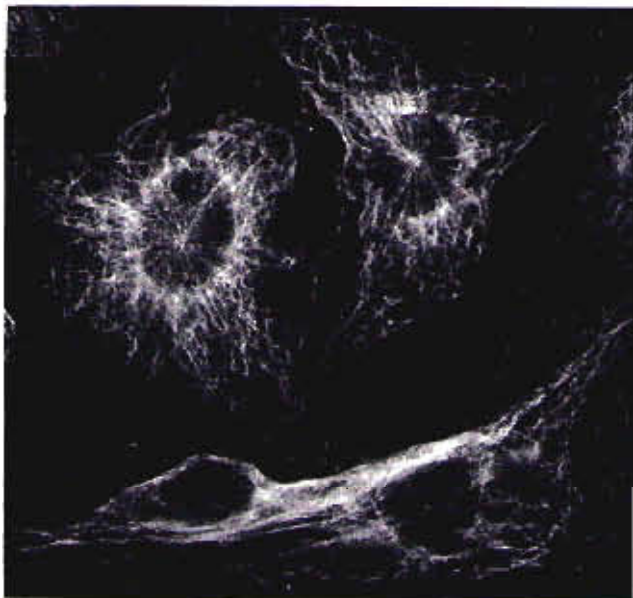


FIGURA 16-4. Cariotipo de un tumor maligno de páncreas en un paciente varón, mostrando una dotación de cromosomas totalmente anormal. La célula a partir de la cual se preparó este cariotipo contiene un total de 60 cromosomas en vez del número normal de 46 (fig. 12-17, c) con dos cromosomas (números 18 y 21) totalmente ausentes. La redistribución de los cromosomas está indicada por flechas pequeñas. (Según Suresh C. Jhanwar, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center.)

movimiento en la dirección original. Cuando las células normales son rodeadas por todos lados por otras células, su motilidad cesa; no pueden desplazarse una sobre otra y formar una capa en el fondo del plato de cultivo. Las células cancerosas por lo general ignoran las señales transmitidas por células vecinas y continúan sus actividades locomotoras

acostumbradas. Como se hizo notar antes, la vecindad de otras células tiene poco efecto sobre el crecimiento de las células cancerosas que continúan proliferando en cultivo celular hasta alcanzar una densidad celular muy alta en comparación con sus contrapartes normales (como en la figura 16-3, d).



(a)



(b)

FIGURA 16-5. Comparación del citoesqueleto microtubular en células cultivadas transformadas y testigos. La disposición de los microtúbulos en estas células se reveló mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos antitubulina. a) Estos fibroblastos se infectaron con un virus tumoral sensible a temperatura y se cultivaron a temperatura más alta restrictiva en la cual la proteína que transforma las células no es funcional. Las propiedades de crecimiento y la disposición de los microtúbulos son normales. b) Las células del mismo cultivo mostradas en a) crecen a la temperatura permisiva más baja en la cual se expresa el fenotipo transformado. El aparato citoesquelético está muy desorganizado. (Según Ronald L. Brown y cols. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:5595, 1981.)

Las células cancerosas también dependen mucho menos de la presencia de suero (fig. 16-6), el cual les suministra factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (FCE) o insulina. La falta de dependencia del suero refleja la capacidad de las células cancerosas de proliferar sin depender de señales transmitidas desde sus receptores de superficie (cap. 15). Además, a diferencia de las células normales, que requieren un sustrato sólido sobre el cual crecer, las células cancerosas generalmente pueden crecer suspendidas en un medio formado por agar suave o metilcelulosa viscosa. Por esta característica, se dice que las células cancerosas han perdido su *dependencia a la fijación*, de la cual depende el crecimiento de células normales. Más importante aún, las células normales en cultivo muestran capacidad limitada para la división celular; luego de un número finito de divisiones mitóticas sufren un proceso de envejecimiento que las incapacita para continuar creciendo y dividiéndose. Por otro lado, las células cancerosas aparentemente son inmortales en el sentido de que continúan dividiéndose de manera indefinida.

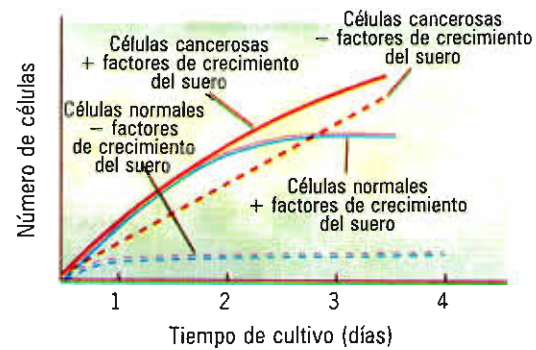


FIGURA 16-6. Efectos de la privación de suero sobre el crecimiento de las células normales y transformadas. En tanto continúe el crecimiento de las células cancerosas, independientemente de la presencia o ausencia de factores de crecimiento exógenos, las células normales requieren estas sustancias en su medio para que el crecimiento siga adelante. El desarrollo de las células normales se interrumpe conforme se agotan los factores de crecimiento en el medio.

16-2 Causas del cáncer

En 1775, el cirujano británico Percival Pott estableció la primera correlación conocida entre un agente ambiental y el desarrollo de cáncer cuando concluyó que la elevada incidencia de cáncer en la cavidad nasal y en la piel del escroto, observada en limpiadores de chimeneas, se debía a su exposición crónica al hollín. En los últimos decenios de esta época se han aislado sustancias químicas carcinógenas del hollín junto con cientos de otros compuestos que demostraron capacidad para causar cáncer en animales de laboratorio. Además de varias sustancias químicas, se ha demostrado que un gran número de otros tipos de agentes son carcinógenos, incluyendo varios tipos de radiación ionizante y algunos virus que contienen DNA y RNA. Todos estos agentes muestran una propiedad en común: pueden provocar cambios en el *genoma*. Las sustancias químicas carcinógenas, como las presentes en el hollín o el humo de cigarrillos, casi siempre se puede demostrar que son mutágenos directos o se pueden convertir en compuestos mutágenos por acción de las enzimas celulares (fig. 16-7). De igual manera, la radiación ultravioleta, causa principal del cáncer de piel, también es fuertemente mutágena (pág. 567).

Algunos virus son capaces de infectar células de vertebrados y transformarlas en células cancerosas. Estos virus se dividen en dos grandes grupos: **virus DNA tumorales** y **virus RNA tumorales**, según el tipo de ácido nucleico encontrado en la partícula viral madura. Entre los virus DNA capaces de transformar células se encuentran el virus polio, el virus del simio 40 (SV40), el adenovirus y virus parecidos al herpes. Los virus RNA tumorales o retrovirus tienen una estructura similar al HIV (fig. 1-21) y son el tema de *La vía experimental* al final de este capítulo. Aunque el uso de virus tumorales en el laboratorio es muy valioso para identificar genes que participan en la carcinogénesis, dichos virus sólo causan unos cuantos tipos menores de cáncer humano, indicados en el cuadro 16-1. Los virus tumorales pueden transformar células debido a que contienen

genes cuyos productos interfieren con las actividades normales de regulación del crecimiento de la célula.

La determinación de las causas de diferentes tipos de cáncer es una tarea realizada por *epidemiólogos*. La causa de ciertos tipos de cáncer es evidente; por ejemplo, fumar causa cáncer de pulmón y la exposición a la radiación ultravioleta genera cáncer de piel. Pero a pesar de numerosos estudios, todavía se desconoce la causa de la mayor parte de los otros tipos de cáncer humano. Por ejemplo, es imposible determinar el número de tipos de cáncer que se pueden atribuir a carcinógenos sintéticos en comparación con carcinógenos naturales presentes en la dieta. El hombre vive en ambientes complejos y está expuesto a muchos carcinógenos potenciales en un patrón cambiante durante periodos de varios decenios. Los intentos para determinar causas de *cáncer a partir de una montaña de datos estadísticos* obtenidos de respuestas a cuestionarios acerca de los estilos de vida individuales han demostrado ser una tarea casi irrealizable. Esto se ilustra por los resultados recientemente obtenidos a partir de un estudio de 16 años de duración efectuado por 120 000 enfermeras que sugieren que la ingestión de grasas en la dieta no puede ser un factor significativo en el desarrollo de cáncer mamario, como generalmente se piensa. Al mismo tiempo, el estudio suministró mayores datos para establecer un vínculo entre la ingestión de grasa en la dieta y el desarrollo de cáncer de colon.

El análisis de algunos tipos de mutaciones causadas por carcinógenos específicos ha proporcionado información más específica, como la causa de algunos pocos tipos de cáncer. Por ejemplo, se cree que la aflatoxina B producida por ciertos mohos es uno de los principales factores que contribuyen a la elevada ocurrencia de cáncer hepático en China, donde los granos y las nueces se almacenan en condiciones que favorecen el crecimiento del moho. La aflatoxina B causa una sustitución característica G → T en un par de bases del codón 149 dentro del gen p53 supresor del tumor, y de esta manera permite a los epidemiólogos efec-

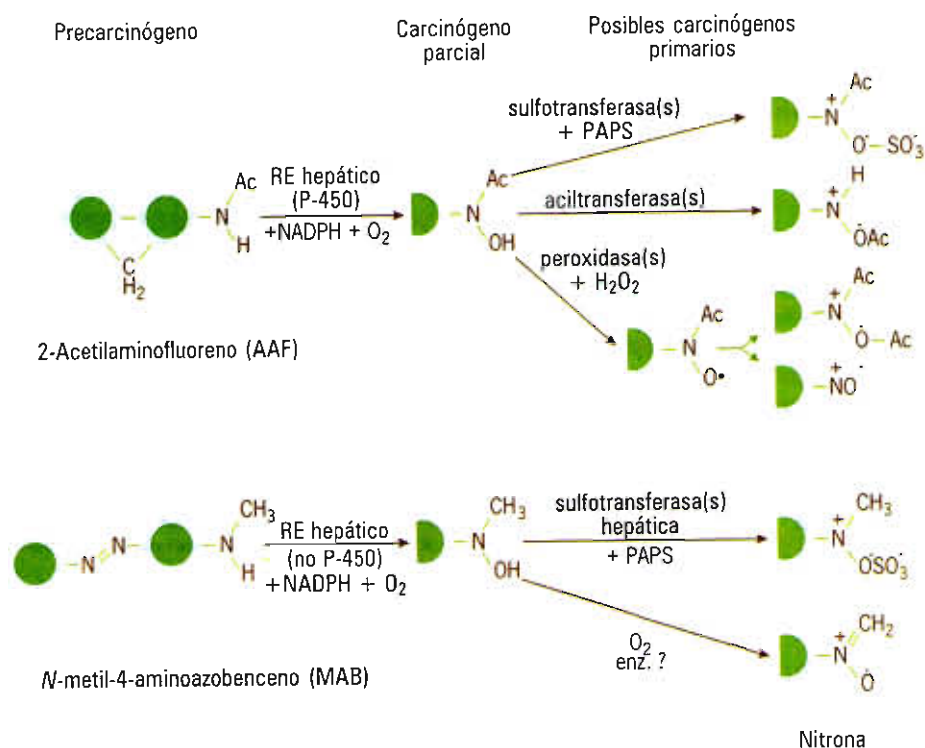


FIGURA 16-7. Activación de un compuesto para convertirse en carcinógeno activo mediante la acción de enzimas celulares. Ninguno de los dos compuestos a la izquierda es carcinógeno, pero ambos pueden convertirse en carcinógenos activos por acción de las enzimas hepáticas. (PAPS [3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato] es un donador de sulfato activado empleado por algunas enzimas que transfieren sulfato.) (Según J.A. Miller y E.C. Miller, *Origins of Human Cancer*, Hiatt, H.H. y cols., eds. 1977. Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

CUADRO 16-1 Virus vinculados con tumores humanos

Tipo de virus	Proliferaciones benignas	Tumor maligno
Virus de Epstein-Barr	Leucoplasia pilosa Mononucleosis infecciosa	Linfoma de Burkitt Cáncer nasofaríngeo Linfoma de células B en pacientes inmunosuprimidos
Virus de la hepatitis B	Hiperplasia focal hepática	Carcinoma hepatocelular
Virus del papiloma humano tipos 5, 8, 14, 17, 20	Placas cutáneas y papilomas en pacientes con EV**	Carcinoma cutáneo, de ordinario en sitios expuestos al sol en pacientes con aloinjerto renal y en pacientes con EV
Virus del papiloma humano tipos 16, 18, 31*, 33, 35*, 39*, 45*, 51*, 52, 56*, 58*, 59*, 61*	Neoplasia cervical intraepitelial; vulvar, del pene y neoplasias intraepiteliales perianales	Cáncer cervical Cáncer vulvar Cáncer de pene Cáncer anal y perianal
Virus del papiloma humano tipos 6, 11	Condiloma acuminado	Carcinoma verrugoso de vulva y pene, tumores de Buschke-Löwenstein
Virus de la leucemia humana de células T de tipo I	Leucemia latente	Leucemia de células T del adulto

* Rara vez se encuentran.

** *Epidermodisplasia verruciforme*.

FUENTE: H. zur Hausen, *Science* 254:1168, 1991. Copyright 1991 American Association for the Advancement of Science.

tuar algunas determinaciones acerca del efecto del carcinógeno en la población.

16-3 Genética del cáncer

El cáncer es una de las dos principales causas de muerte en los países occidentales. Más o menos afecta a uno de cada tres individuos. Así considerado, el cáncer es una enfermedad muy común. Pero a nivel celular el desarrollo de un cáncer es un acontecimiento notablemente raro. Siempre que se estudian en genética las células de un tumor canceroso, casi de manera invariable se descubre que se originan a partir de una sola célula. Por lo tanto, a diferencia de otras enfermedades que requieren la modificación de un gran número de células, el cáncer se produce por la proliferación descontrolada de una sola célula descarriada (por esta razón se dice que es *monoclonal*). Consideremos por un momento que el cuerpo humano contiene trillones de células, billones de las cuales sufren división celular en cualquier momento determinado. Aunque casi cualquiera de estas células en división tiene la posibilidad de cambiar su composición genética y desarrollar un tumor maligno, esto sólo ocurre en casi un tercio de la población humana durante todo su ciclo de vida.

Una de las principales razones de que la mayor parte de las células no generen tumores cancerosos es que la transformación maligna requiere más que una simple alteración genética. El desarrollo de un tumor maligno (*tumorigénesis*) es un proceso de múltiples etapas caracterizado por la **progresión** de alteraciones genéticas que reducen cada vez más la capacidad de respuesta de las células al mecanismo regulador normal del cuerpo y las vuelve más capaces de invadir tejidos normales, lo que causa que el tumor amenace cada vez más la vida de la persona. La evolución de un tumor con frecuencia se compara a la evolución biológica. La evolución biológica y el avance del tumor son impulsados por un proceso en el cual el éxito individual se mide por el número de descendientes que produce. Las células dentro de un tumor que crecen con mayor rapidez y de la manera menos controlada son favorecidas en comparación con otras células del tumor que producen un menor número de células hijas. Como veremos en breve, las mutaciones en genes diferentes confieren propiedades diferentes a la célula en la cual ocurren. El resultado es la selección de cambios genéticos que tienden a promover crecimiento y división descontrolados, y las células en las cuales ocurre esto tienden a convertirse en el tipo de célula predominante del tumor.

En muchos casos, la primera etapa en el desarrollo de un tumor maligno es la formación de un **tumor benigno** compuesto de células que ya no responden al control de crecimiento normal, pero que carecen de la capacidad para invadir tejidos normales, o provocar metástasis en sitios distantes. Algunos tumores benignos tienen pocas probabilidades de convertirse en malignos, pero otros, como los pólipos que pueden aparecer en la pared del colon (fig. 16-17), es muy probable que produzcan células que atraviesan la frontera entre los estados benigno y maligno. El *frotis* de Papanicolaou es una prueba en busca de células pre-

cancerosas en el epitelio de revestimiento del cuello uterino. El desarrollo de cáncer del cuello uterino típicamente dura más de 10 años y se caracteriza por células de aspecto crecientemente anormal (menos bien diferenciadas que las células normales, con núcleos de mayor tamaño, como en la figura 16-8). Cuando se descubren células de aspecto anormal, se puede localizar y destruir el sitio precanceroso en el cuello uterino mediante tratamiento con rayo láser, crioterapia o cirugía.

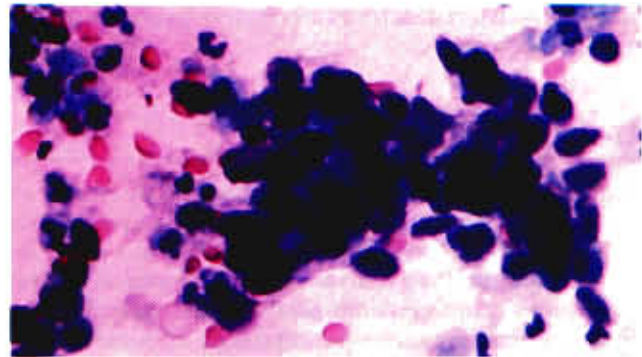
Como se demostrará en el siguiente análisis, los genes que participan en la carcinogénesis constituyen un subconjunto específico del genoma cuyos productos están implicados en actividades tales como progresión de una célula a través del ciclo celular, adherencia de la célula con sus vecinas y reparación de daños al DNA. Estudios de diferentes tipos de cáncer humano, como cáncer de colon, cáncer mamario o cáncer renal, revelan que algunos genes pueden participar en varios tipos de cáncer diferente, en tanto que otros genes sólo participan en la formación de uno o unos pocos tipos de cáncer. Algunos genes tienden a sufrir mutaciones en las primeras etapas del desarrollo de un cáncer particular y otros genes muestran tendencia a sufrir mutaciones en etapas tardías. Un ejemplo de este tipo de evolución genética que puede conducir al desarrollo de cáncer de colon se muestra en la figura 16-9. La mayor parte de los estudios de cambios genéticos en diferentes etapas de avance del tumor sugieren que el orden preciso en el cual se pierden o alteran las funciones del gen tiene menor importancia que los efectos acumulativos de las pérdidas. En otras palabras, se cree que el efecto combinado de varias mutaciones es la causa del desarrollo de un estado maligno completo.

Antes de iniciar un estudio detallado de algunos genes prominentes en el desarrollo de cáncer humano es necesario hacer notar que los cambios genéticos no son los únicos factores importantes. Una célula puede mostrar algunos cambios genéticos que sería de esperar produjeran el desarrollo de un tumor maligno, pero dichos cambios pueden permanecer en estado latente por el resto de la vida del individuo. No se sabe mucho acerca de las influencias no genéticas, o "epigenéticas", que actúan sobre una célula para permitirle expresar su fenotipo maligno, pero dichas influencias repetidamente han demostrado que desempeñan cierto papel en la génesis de numerosos tipos de cáncer.

La existencia de influencias no genéticas en la tumorigénesis fue demostrada por primera vez por Isaac Berenblum, de la Universidad de Oxford, en estudios sobre piel de ratón. En estos experimentos se demostró que se pueden distinguir dos fases distintas; éstas se conocen como **inicio** y **promoción**. Berenblum observó que la aplicación repetida de sustancias mutágenas a la piel, como alquitrán de hulla, provoca la aparición de piel malignizada en animales de laboratorio, pero que la aplicación de una sola dosis baja del agente no es suficiente para lograr este fin. Sin embargo, si la única aplicación de alquitrán de hulla va seguida de tratamiento con otro tipo de agente, como aceite de crotón, entonces se puede inducir la formación de tumores en la piel. La mayor parte de los tumores fueron papilomas benignos, pero un pequeño porcentaje dio lugar a car-



(a)



(b)

FIGURA 16-8. Detección de células anormales (premalinas) en un frotis de Papanicolaou. *a)* Células epiteliales escamosas normales del cuello uterino. Las células presentan forma uniforme con un pequeño núcleo localizado en el centro. *b)* Células anormales de un caso de carcinoma *in situ* que constituye un cáncer preinvasivo del cuello uterino. Las células tienen formas heterogéneas y núcleos grandes. (Micrografía según Visuals Unlimited/© Cabisco.)

cinomas malignos. El aceite de crotón por sí mismo no es carcinógeno, y requiere una aplicación previa de alquitrán de hulla. El aceite de crotón es más bien *promotor* del desarrollo de tumores ya iniciados por el carcinógeno. Todavía se pueden desarrollar tumores aun si el tratamiento con aceite de crotón se retrasa durante varios meses después de la aplicación del alquitrán de hulla, hecho que ilustra el cambio hereditario permanente inducido por el alquitrán de hulla mutágeno. En tanto los iniciadores del tumor actúan provocando mutaciones genéticas, se cree que los promotores tumorales funcionan principalmente estimulando el crecimiento y la proliferación de las células, lo que favorece que ocurran mutaciones adicionales causantes de cáncer necesarias para la malignización completa de las células. Por ejemplo, en 60% de los adenomas benignos más pequeños del colon se observan mutaciones del gen *PAC*, lo que sugiere que este gen actúa como iniciador en la formación del cáncer de colon (fig. 16-9). Una vez que el gen *PAC* sufre mutación, el rápido crecimiento celular que ocurre en la capa epitelial del colon incrementa la probabilidad de alteraciones genéticas subsecuentes que conducen a la aparición del tumor maligno.

Los estrógenos pueden actuar como promotores de tumor en el desarrollo del cáncer mamario. Los datos epidemiológicos indican una correlación entre tiempo de exposición de la mujer al estrógeno circulante y riesgo de desarrollar cáncer mamario. Por ejemplo, las mujeres a quienes se les quitan los ovarios en etapas tempranas de vida y no se les suministra terapéutica de sustitución con estrógenos rara

vez presentan cáncer mamario. Puesto que el estrógeno no es mutágeno, al parecer la elevación del riesgo de generar un tumor es por favorecer el crecimiento y la división de las células específicas. A la inversa, los compuestos que bloquean la acción estrogénica pueden disminuir el riesgo de cáncer mamario. El tamoxifén es un compuesto no esteroide que se enlaza a los receptores de estrógeno y bloquea su enlace, inhibiendo así el crecimiento de células cancerosas mamarias que con frecuencia depende de la estimulación por estrógenos. Se ha empleado tamoxifén durante más de 10 años para tratar pacientes con cáncer mamario, pero recientemente se aprobó para ensayos a gran escala en mujeres saludables cuya historia familiar indica que se encuentran en alto riesgo de desarrollar la enfermedad. El protocolo de estos ensayos es motivo de gran debate, porque el tratamiento con tamoxifén puede incrementar el riesgo de una persona para desarrollar cáncer endometrial y trastornos circulatorios.

Carcinomas comunes, como los de mama, colon, próstata y pulmón, se originan en tejidos epiteliales que en general son afectados en un nivel relativamente elevado de división celular. Lo mismo se puede afirmar de las leucemias, que aparecen en las células sanguíneas precursoras en rápida división. Estos tejidos contienen una población de estirpes celulares que se dividen por mitosis, conservando un número relativamente constante de las estirpes celulares, aunque también suministra las células que se diferencian en células especializadas de vida corta del epitelio o de la sangre. Conforme se dividen, las estirpes celulares pueden

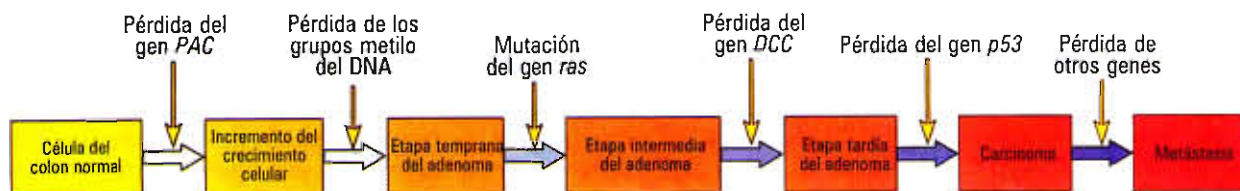


FIGURA 16-9. Una de las diferentes secuencias posibles de cambios genéticos en un linaje celular que puede conducir al desarrollo de cáncer de colon. Las funciones de la mayor parte de estos genes se analizan posteriormente en el capítulo.

acumular varias mutaciones que causan la transformación maligna.

Genes supresores de tumor y oncogenes

Los genes implicados en la carcinogénesis se dividen en dos amplias categorías: genes supresivos de tumor y oncogenes. Los **genes supresores de tumor** codifican proteínas que restringen el crecimiento celular y evitan que las células se malignicen (fig. 16-10, a). Originalmente se descubrió la existencia de estos genes por estudios efectuados a fines del decenio de 1960, en los cuales se fusionaron entre sí células malignas y células normales de roedores. Se observó que algunas de las células híbridas formadas por este tipo de fusión perdieron sus características malignizantes, lo que sugiere que las células normales poseen alguna propiedad capaz de suprimir dichas características en las células cancerosas luego de la fusión. Se reunieron mayores datos acerca de la existencia de genes supresores de tumor a partir de la observación de que regiones específicas de un cromosoma particular siempre se encuentran borradas en las células de ciertos tipos de cáncer. Si se correlaciona la ausencia de estos genes con el desarrollo de un tumor, entonces se deduce que la presencia de estos genes normalmente evita la formación del tumor.

Una vez identificada una región del cromosoma como sitio probable de un gen supresor de tumor, los genetistas moleculares pueden iniciar la búsqueda de dicho gen en esa región del DNA. Las funciones de las proteínas codificadas

por un gran número de estos genes es en la actualidad tema de intensa investigación. Se dice que los genes supresores del tumor actúan de manera recesiva porque ambas copias del gen (una de cada cromosoma homólogo) deben borrarse al sufrir mutación antes de perder su función protectora.

Los **oncogenes**, por otro lado, codifican proteínas que promueven la pérdida de control del crecimiento y la conversión de una célula a un estado maligno (fig. 16-10, b). La existencia de oncogenes se descubrió en una serie de investigaciones acerca de virus RNA tumorales reseñadas en *La vía experimental* de este capítulo. Estos virus pueden transformar una célula normal en una célula maligna porque son portadores de un gen que codifica una proteína que interfiere con las actividades normales de la célula. Debido a su capacidad para transformar células, estos genes virales reciben el nombre de "oncogenes". El punto crítico en estos estudios se presentó en 1976 cuando se descubrió que un oncogen llamado *src* que se encontraba en un virus RNA tumoral, llamado *virus del sarcoma aviario* (VSA), también estaba presente en el genoma de células no infectadas (comentado en la página 693). En realidad, el oncogen no es un gen viral, sino un gen celular incorporado al genoma del virus durante una infección previa. Pronto se comprobó que las células poseen varios genes, ahora conocidos como **protooncogenes**, con potencial para alterar las actividades propias de la célula y llevarla hacia el estado maligno (fig. 16-11).

Según analizaremos más adelante, los protooncogenes codifican proteínas que tienen funciones diversas en las actividades *normales* de una célula. Los protooncogenes pue-

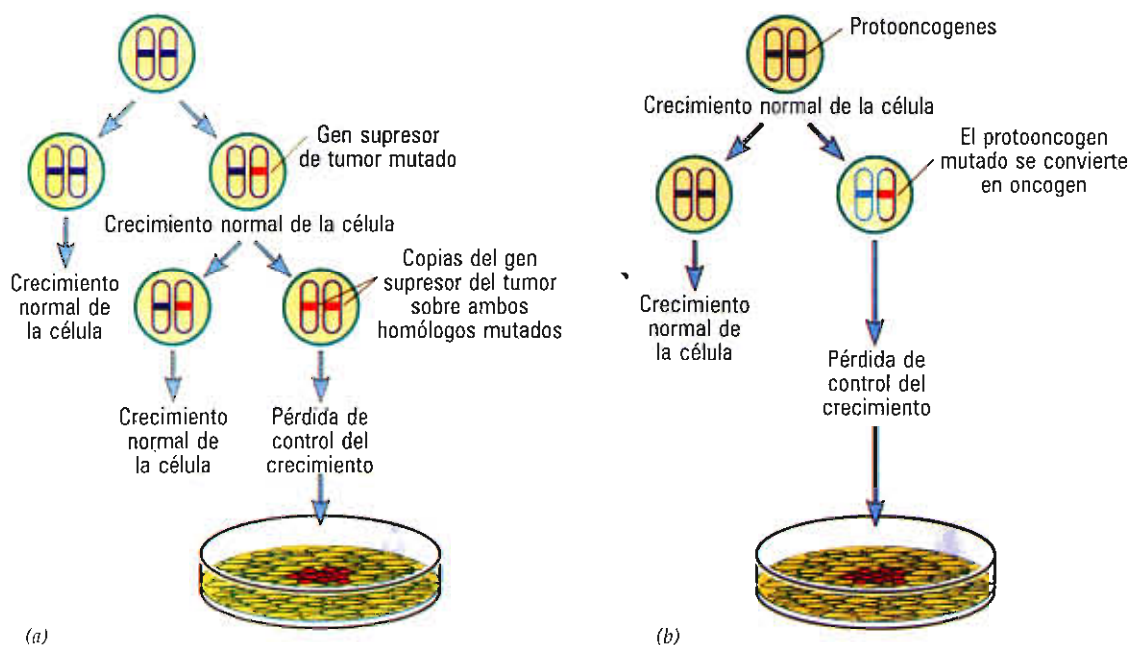


FIGURA 16-10. Efectos contrastantes de mutaciones en genes supresores de tumor y en oncogenes. En tanto una mutación en una de las dos copias (alelos) de un oncogene sea suficiente para causar la pérdida de control del crecimiento, se deben alterar ambas copias de un gen supresor de tumor para inducir el mismo efecto.

den convertirse en oncogenes (activados) de diferentes maneras (fig. 16-11). Por ejemplo,

1. El gen puede sufrir mutaciones de modo que se alteran las propiedades del producto del gen y ya no puede efectuar su actividad normal.
2. Una mutación en alguna secuencia reguladora cercana puede alterar la expresión del gen, de modo que el producto del gen es demasiado poco o excesivo.
3. Puede ocurrir redistribución del cromosoma que lleva una secuencia DNA desde un sitio distante en el genoma hasta un punto muy próximo del gen, lo que puede alterar la expresión del gen o la naturaleza del producto del mismo, según se indica en la figura 16-11, *c*.

Cualquiera de estos tipos de alteraciones genéticas puede causar que una célula responda menos a los controles normales de crecimiento y se comporte de cierta manera como célula maligna. A diferencia de los genes supresores de tumor que actúan con carácter recesivo, los oncogenes actúan con carácter dominante, o sea que una sola copia del oncogen puede provocar que la célula exprese el fenotipo alterado, sin importar si existe o no una copia normal no activada del gen sobre el cromosoma homólogo (fig. 16-10,

b). Los investigadores han tomado ventaja de esta propiedad para identificar oncogenes introduciendo el DNA sospechoso de contener el gen en células cultivadas y observando las células en busca de datos de alteración de las propiedades de crecimiento.

Anteriormente se había establecido que el desarrollo de malignidad en el hombre requiere más que una simple alteración genética. La razón de esta afirmación será más evidente ahora que hemos observado que hay dos tipos de genes causantes de la formación del tumor. Se cree que mientras una célula posea su dotación completa de genes supresores de tumor, estará protegida contra los efectos de un oncogen por razones que serán evidentes cuando analicemos las funciones de estos genes, más adelante. Puesto que el efecto protector de un supresor de tumores sólo se pierde después de inactivar ambas copias del gen, es evidente que deben ocurrir dos mutaciones o supresiones independientes antes que la célula sea vulnerable a los sucesos que inician la formación de un tumor. Además, puesto que la mayor parte de los tumores contienen alteraciones tanto en los genes supresores de tumor como en los oncogenes, al parecer la pérdida de las funciones de un supresor de tumor dentro de la célula de ordinario no es suficiente, por sí mismo, para que la célula sufra un proceso de con-

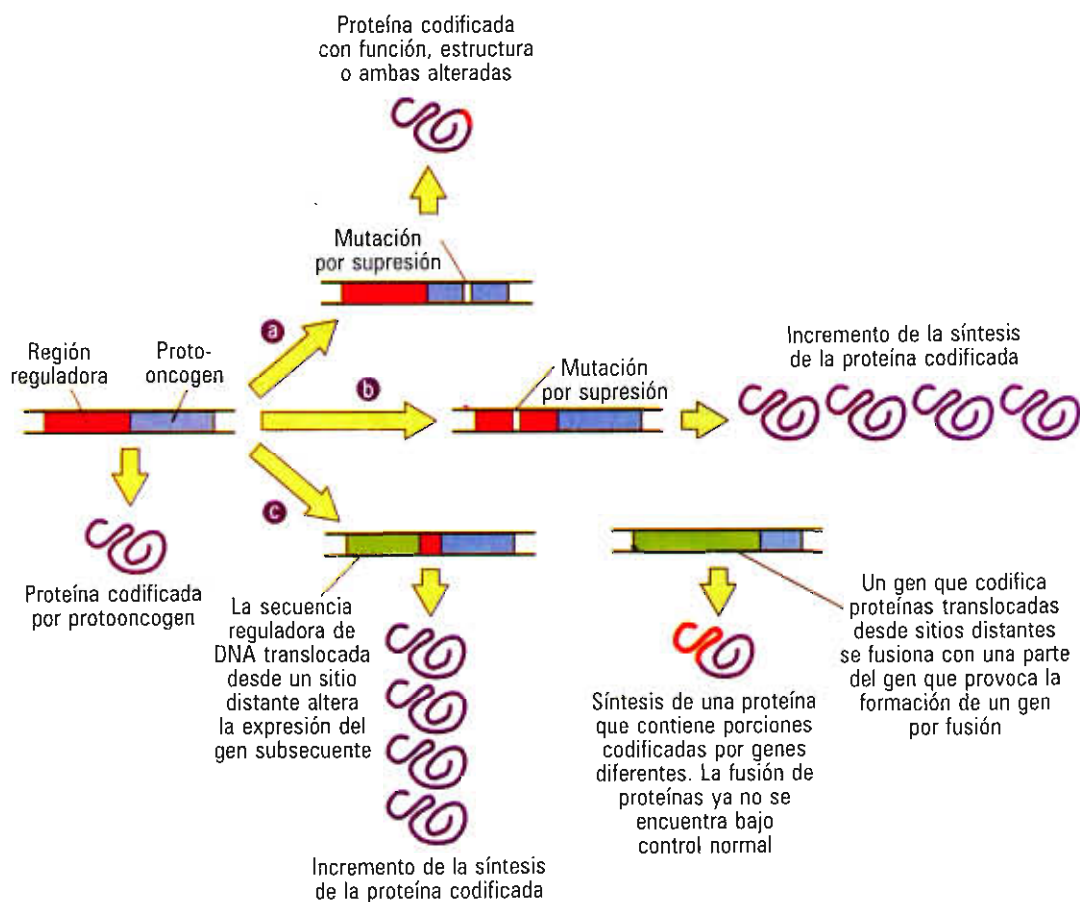


FIGURA 16-11 Activación de un protooncogen para convertirlo en oncogen. La activación se puede lograr de varias maneras, según se indica en esta figura. En la vía *a*, una mutación del gen altera la estructura y función de la proteína codificada. En la vía *b*, una mutación en una secuencia reguladora subsecuente altera el nivel de expresión del gen. En la vía *c*, una redistribución del gen produce un nuevo segmento de DNA en la vecindad o adelante del gen, alterando su expresión o la naturaleza de la proteína codificada.

versión maligna. Más bien, cuando menos en la mayor parte de los casos, la pérdida de las funciones del supresor de tumor debe acompañarse de la conversión de un protooncogen en un oncogen antes que las células se malignicen por completo. Aun entonces, a veces la célula no muestra todas las propiedades requeridas para invadir a los tejidos que la rodean o para formar colonias secundarias por metástasis, sino que puede requerir mutaciones oncogénicas adicionales para configurar el fenotipo completo que ponga en riesgo la existencia del individuo. En general, el número de genes alterados aumenta paralelamente con la evolución de la virulencia maligna del tumor. Los estudios de carcinoma colorrectal indican, por ejemplo, que se requieren mutaciones hasta de cuatro a seis genes diferentes para el desarrollo de un tumor completamente maligno (fig. 16-9).

Podemos ahora retornar a las funciones de los productos codificados por genes supresores de tumor y oncogenes, y examinar de qué manera las mutaciones en estos genes pueden provocar que una célula se convierta en maligna.

Genes supresores de tumor

El desarrollo de casi todos los tipos de cáncer humano parece acompañarse de la pérdida o la mutación de uno o más genes supresores de tumor. En el momento actual, casi una docena de genes se han implicado como supresores de cáncer humano (cuadro 16-2), y se espera que su número crezca rápidamente en unos cuantos años más. Algunos de los genes supresores de tumor identificados participan como factores causales en el desarrollo de una amplia gama de diferentes tipos de cáncer, en tanto que otros parecen desempeñar un papel en la formación de sólo uno o un pequeño número de tipos de cáncer. El descubrimiento de la importancia de los genes supresores de tumor en la carcinogénesis humana abrió la puerta al desarrollo de nuevas estrategias para luchar contra el cáncer. Por ejemplo, si se pudiera introducir una copia normal de un gen supresor de tumor en células tumorales que carecen de una copia fun-

cional, entonces sería posible llevar de nuevo a la célula a obedecer los controles normales de crecimiento. Este tipo de geneterapia se ha aplicado con éxito a células cancerosas aisladas de tumores humanos y desarrolladas en cultivo, pero todavía está por verse si pueden o no aplicarse a células cancerosas que crecen en el cuerpo. Una estrategia alternativa podría ser tratar a los pacientes con fármacos que simulen los efectos de los productos del gen supresor de tumor, pero esto aún es un proyecto lejano.

El primer gen supresor de tumor bajo estudio se relaciona con un cáncer raro de la infancia en la retina, llamado *retinoblastoma*. La ocurrencia de retinoblastoma sigue dos patrones distintos: aparece con elevada frecuencia en miembros de ciertas familias, y con baja frecuencia (*esporádicamente*) entre los miembros de la población general. El gen causante de esta enfermedad se denomina *RB* (o *Rb*). El hecho de que el retinoblastoma aparezca en ciertas familias sugiere que este cáncer puede ser hereditario. El examen de las células de niños afectados de una versión hereditaria del retinoblastoma indica que un miembro del 13o. par de cromosomas homólogos carece de un pequeño fragmento de la parte interior del cromosoma. La supresión se encuentra en todas las células del niño, tanto en las células del cáncer retiniano como en células de cualquier parte del cuerpo, lo que indica que la aberración cromosómica se hereda de alguno de los progenitores.

Puesto que la presencia de una supresión en uno solo de los dos cromosomas homólogos se acompaña del desarrollo de retinoblastoma, se dice que la enfermedad se hereda con rasgo genético dominante. Sin embargo, el examen más atento de la forma de transmisión del retinoblastoma revela que a diferencia de la mayor parte de las enfermedades hereditarias dominantes, como la enfermedad de Huntington, en la cual el individuo que hereda genes alterados o ausentes invariablemente desarrolla la enfermedad, los niños que heredan un cromosoma que ha perdido el gen del retinoblastoma heredan una fuerte disposición a desarrollar retinoblastoma y no la propia enfermedad. En realidad,

CUADRO 16-2. Algunos genes conocidos o candidatos a supresores de tumor

Gen	Tipo de cáncer	Localización del producto	Modo de acción	Síndrome hereditario
PAC	Carcinoma de colon	¿Citoplasma?	?	Poliposis adenomatosa familiar
DCC	Carcinoma de colon	Membrana	Molécula de adherencia celular	—
NF1	Neurofibromas	Citoplasma	Activador GTPasa	Neurofibromatosis tipo 1
NF2	Schwannomas y meningiomas	¿Membrana interna?	¿Unión de membrana al citoesqueleto?	Neurofibromatosis tipo 2
p53	Cáncer de colon; muchos otros	Núcleo	Factor de transcripción	Síndrome Li-Fraumeni
RB	Retinoblastoma	Núcleo	Factor de transcripción	Retinoblastoma
RET	Carcinoma de tiroides; feocromocitoma	Membrana	Receptor de tirosincinasa	Neoplasia endocrina múltiple tipo 2
VHL	Carcinoma de riñón	¿Membrana?	?	Enfermedad de von Hippel-Lindau
TW-1	Nefroblastoma	Núcleo	Factor de transcripción	Tumor de Wilms

FUENTE: J. Marx, *Science* 261:1385, 1993. Copyright 1993 American Association for the Advancement of Science.

casi 10% de los individuos que heredan un cromosoma con supresión de *RB* nunca desarrollan cáncer de retina. Sin embargo, la mayoría de los individuos con esta predisposición genética presentan varios tumores de retina que se originan independientemente entre sí y afectan ambos ojos. En contraste, pueden aparecer casos esporádicos de la enfermedad en forma de un tumor simple en un solo ojo.

Las bases genéticas del retinoblastoma fueron explicadas por primera vez en 1971 por Alfred Knudson, de la Universidad de Texas. Knudson propuso que el desarrollo de retinoblastoma requiere que ambas copias del gen *RB* de una célula retinal deben estar suprimidas o sufrir mutación antes que la célula pueda dar origen a un retinoblastoma. En otras palabras, el cáncer se origina como resultado de dos "golpes certeros" independientes. Entre las personas que desarrollan esporádicamente este raro cáncer, el tumor se inicia a partir de una célula de la retina en la cual ambas copias del gen *RB* han sufrido mutaciones sucesivas (fig. 16-12, *a*). Puesto que la probabilidad de que ambas copias del gen *RB* en la misma célula sean blanco de una mutación debilitante es sumamente improbable, la ocurrencia del cáncer en la población general también es muy rara. En contraste, las células de una persona que hereda un cromosoma con supresión *RB* ya tienen recorrida "la mitad del camino" para la conversión maligna, lo que explica por qué

razón los individuos en estas condiciones están más predispuestos a desarrollar cáncer. Una mutación del gen *RB* restante en cualquiera de las células de la retina produce una célula que carece de un gen *RB* normal y por lo tanto es incapaz de producir una proteína *RB* funcional (llamada pRb) (fig. 16-12, *b*). Esto se confirma examinando células tumorales de pacientes con predisposición heredada al retinoblastoma y la observación de que una copia del gen ha sufrido supresión, y la otra, mutación. La ausencia del producto funcional de un gen *RB* parece ser suficiente para promover el desarrollo de este cáncer particular.

Aunque las deficiencias del gen *RB* se manifiestan primero por el desarrollo de cáncer de retina, este no es el fin de la historia. Las personas que sufren la forma hereditaria de retinoblastoma también están en alto riesgo de desarrollar otros tipos de tumores en etapa tardía de la vida, particularmente sarcoma de tejido blando (tumores de origen mesenquimatoso). Además, estudios recientes revelan que las mutaciones en ambos alelos *RB* son un hecho común en células de muchos tumores diferentes, incluyendo los tumores de mama, próstata y pulmón.¹ Cuando se cultivan

¹ La razón de que las personas con un defecto hereditario en un alelo del gen *RB* desarrollen retinoblastoma y sarcomas de tejido blando, pero no cánceres más comunes, todavía se desconoce.

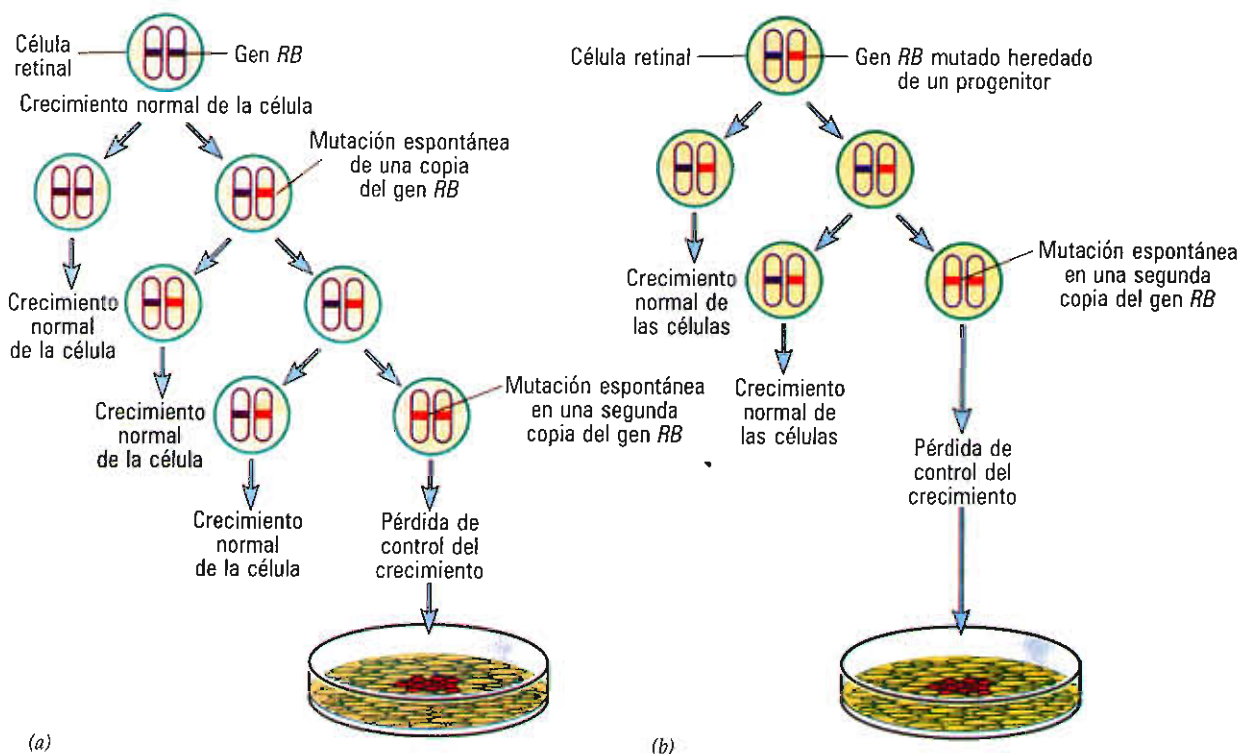


FIGURA 16-12. Mutaciones en el gen *RB* que pueden producir retinoblastoma. *a*) En casos esporádicos (no familiares) de esta enfermedad, un individuo tiene al principio de su vida dos copias normales del gen *RB* en el cigoto, y el retinoblastoma aparece sólo en aquellos casos raros donde una célula determinada de la retina acumula mutaciones independientes en ambas copias de genes homólogos. *b*) En casos familiares de la enfermedad, el individuo inicia su vida con una copia anormal del gen *RB*, que de ordinario presenta supresión. Por lo tanto, todas las células de la retina han perdido la función de cuando menos uno de los dos alelos *RB*. Si el otro alelo *RB* en una célula retinal se inactiva por alguna razón, en general como resultado de mutación puntual, esta célula dará lugar a un tumor retinal.

células de estos tumores *in vitro*, la reintroducción de un gen *RB* de tipo nativo al interior de las células es suficiente para suprimir su fenotipo canceroso, indicando que la pérdida de la función de este gen contribuye de manera significativa a la tumorigénesis. Dada la importancia del gen *RB* en la regulación del crecimiento de una gran variedad de tejidos, muchos laboratorios han dirigido su atención a determinar el papel del producto del gen *RB*.

Papel de la pRb en la regulación del ciclo celular. La importancia del ciclo celular en el crecimiento y proliferación de las células se analizó en los capítulos 14 y 15, donde se hizo notar que los factores que controlan el ciclo celular pueden desempeñar un papel crucial en el desarrollo de cáncer. Datos procedentes de diversos estudios indican que uno de los papeles primarios de la pRb es regular el paso de células desde la etapa G_1 del ciclo celular a la fase S, durante la cual ocurre la síntesis de DNA. Como se analiza en la página 585, capítulo 14, la transición de G_1 a S es un momento de compromiso para la célula, puesto que una vez que la célula entra a S invariablemente prosigue a través del resto del ciclo celular y entra en mitosis. La síntesis del DNA requiere de las diferentes enzimas que participan en la duplicación, analizada en el capítulo 13, pero también requiere muchas actividades adicionales que deben coordinarse estrechamente. Por ejemplo, la duplicación de DNA requiere la síntesis de cuatro tipos de precursores nucleótidos, en tanto que la duplicación de los cromosomas requiere la síntesis de las histonas incorporadas en los nucleosomas recién ensamblados. Por consiguiente, la transición de G_1 a S se acompaña de activación de la expresión de una amplia variedad de genes diferentes, que al parecer están controlados por diversos factores de transcripción.

Entre los factores de transcripción implicados en la activación de genes requeridos para las actividades de la fase S se encuentran los miembros de la familia E2F, que son objetivos clave de la pRb (fig. 16-13). El avance de las células desde G_1 a S se acompaña de fosforilación de la pRb por la cinasa dependiente de ciclina que regula la transición G_1 -S. Al parecer, la forma no fosforilada de la pRb interactúa con factores de transcripción E2F, evitando que se una al DNA y activando los genes requeridos para ciertas actividades de la fase S. Una vez fosforilada la pRb, la proteína libera su E2F unido, permitiendo que el factor de transcripción active la expresión del gen.

La importancia de la pRb en la regulación del ciclo celular se observa en los resultados de varios experimentos. Por ejemplo, la inyección de cantidades excesivas de la proteína pRb no fosforilada a células durante G_1 impide la progresión de las células hacia la fase S. Todavía más revelador es el hecho de que diversos virus DNA tumorales (incluyendo adenovirus, virus del papiloma humano y SV40) codifiquen una proteína que se enlaza a pRb, bloqueando su capacidad para enlazarse a E2F. Al parecer, la capacidad de estos virus para inducir cáncer en células infectadas depende de su capacidad para bloquear la influencia negativa que tiene pRb en la progresión de una célula a través del ciclo celular. Empleando estas proteínas bloqueadoras de pRb, estos virus pueden lograr el mismo resultado que ocu-

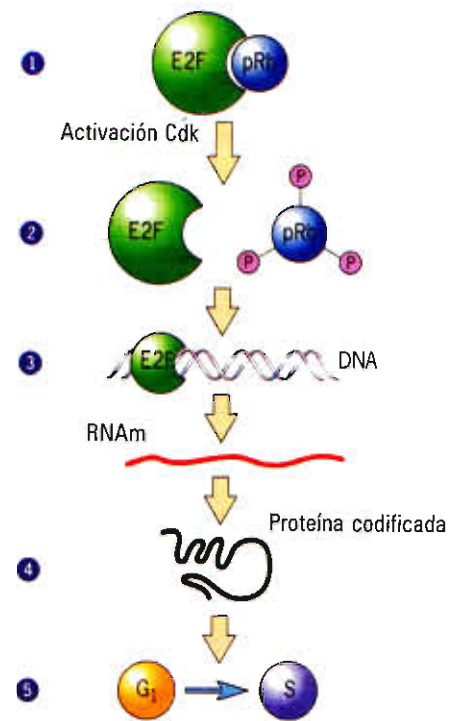


FIGURA 16-13. Papel de la pRb en el control de la transcripción de genes requeridos para la progresión del ciclo celular. Durante G_1 , la pRb no fosforilada se enlaza a los factores de transcripción E2F (paso 1). La activación de la cinasa dependiente de ciclina (Cdk) conduce a la fosforilación de la pRb que ya no puede enlazarse a un E2F (paso 2). Los factores de transcripción liberados se enlazan a secuencias reguladoras en el DNA (paso 3), provocando la síntesis de los productos del gen (paso 4) requeridos para la progresión de las células desde G_1 a la fase S del ciclo celular (paso 5).

re cuando el gen sufre supresión o mutación durante el desarrollo de tumores humanos.

Algunos de los estudios más interesantes acerca del gen retinoblastoma provienen de la investigación de los ratones knockout, o sea, ratones manipulados con técnicas de ingeniería genética que carecen de ambas copias del gen *RB* (son ratones $RB^{-/-}$). Dado el papel aparente de la pRb en la restricción del ciclo celular, se puede esperar que las células de ratones $RB^{-/-}$ se dividan de manera descontrolada y produzcan embriones totalmente aberrantes. Pero en realidad, las etapas muy tempranas del desarrollo prosiguen de manera más bien normal, sin efecto evidente alguno en el ciclo celular, lo que indica que pRb no juega un papel regulador crucial en toda la transición G_1 -S. El examen atento de ciertos tejidos, sin embargo, muestra claras pruebas de defectos en el ciclo celular, según se ilustra en el siguiente ejemplo. Cuando un embrión normal alcanza cierta etapa, las células del cristalino en desarrollo se detienen en G_1 y luego se diferencian en las células altamente especializadas del cristalino. En contraste, estas mismas células en ratones $RB^{-/-}$ continúan sintetizando DNA después de este tiempo cuando sus contrapartes normales han sido eliminadas del ciclo celular, y en seguida las células mueren por un proceso de autodestrucción (llamado *apoptosis*, pág. 658) en vez de diferenciarse en células del cristalino. Estos resulta-

dos sugieren que el producto del gen *RB* normalmente controla la interrupción del ciclo de las células del cristalino en G₁, requerida para una diferenciación normal del cristalino.

Los embriones *RB*^{-/-} mueren al día 12 o 13 como resultado de una falla general del sistema nervioso central en desarrollo y de la eritropoyesis (formación de eritrocitos). Todavía no se aclara la razón de que estos ratones no puedan realizar estos procesos del desarrollo. El papel del gen *RB* en la formación de tumores es más evidente en ratones heterocigotos (*RB*^{+/-}). Los animales con este genotipo se desarrollan durante el periodo embrionario y luego muestran un riesgo mucho mayor de desarrollar cáncer, justo como el hombre, que posee un genotipo *RB*^{+/-}; sin embargo, a diferencia de los humanos, estos ratones son afectados sobre todo por tumores de la hipófisis más bien que retinoblastomas (que nunca se han observado en ratones). Estos resultados confirman la importancia del gen *RB* para suprimir la formación de tumores, pero también indican que hay diferencias importantes entre roedores y humanos, y puede ser difícil extrapolar a los humanos los estudios de carcinogenicidad efectuados en ratones y ratas.

Papel de p53 en la carcinogénesis humana. A pesar de su nombre tan modesto, el gen *p53* puede tener mucho que hacer en el desarrollo del cáncer humano en comparación con cualquier otro componente del genoma. El genoma debe su nombre al producto que codifica, *p53*, que es un polipéptido con peso molecular de 53 000 daltons. Durante muchos años se creyó que *p53* era un oncogen con acción de naturaleza dominante, pero en 1990 se le reconoció como gen supresor de tumor que, cuando está ausente, causa una rara enfermedad hereditaria llamada síndrome de Li-Fraumeni, cuyas víctimas sufren ciertos cánceres con elevada ocurrencia, incluyendo cáncer mamario y leucemia. Como los individuos con la forma hereditaria de retinoblastoma, las personas con el síndrome de Li-Fraumeni sólo heredan una copia funcional del gen supresor de tumores *p53*, y por lo tanto son muy susceptibles al cáncer como resultado de las mutaciones al azar que eliminan la función en la copia residual del gen.

La importancia de *p53* como arma antitumoral es más evidente a partir del dato de que casi 50% de todos los cánceres humanos contienen células con mutaciones puntuales o supresiones en ambas copias del gen *p53*. Además, el grado de alteración de *p53* en un tumor puede servir como indicador de la virulencia del mismo; los tumores compuestos de células portadoras de mutaciones en *p53* tienden a ser más invasivos y con mayor probabilidad de provocar metástasis, y esto se correlaciona con una menor tasa de supervivencia. Está claro que la eliminación de la función *p53* es un paso importante en el avance de muchas células cancerosas hacia un estado de malignización completa. Se han identificado más de mil diferentes mutaciones *p53* entre muestras de tumores humanos, lo que indica que el funcionamiento apropiado de la proteína es muy sensible a cambios incluso ligeros en la secuencia de aminoácidos (fig. 16-14).

Los estudios sugieren que *p53* puede suprimir la formación de células cancerosas mediante diferentes mecanis-

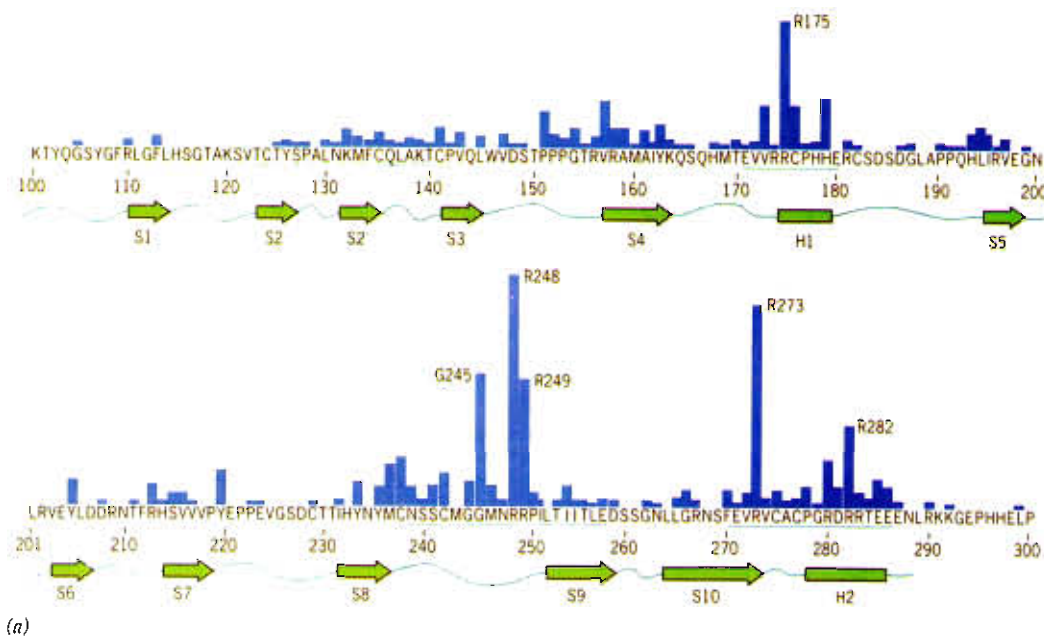
mos. En el capítulo 14 vimos de qué manera actúa *p53* como factor de transcripción que activa la expresión de un gen que codifica una proteína (*p21*) e inhibe la cinasa dependiente de ciclina reguladora del avance de la célula a través del ciclo celular (pág. 586). Como consecuencia de esta cascada de acontecimientos, las células que no están preparadas para entrar a la fase S por alguna u otra razón son bloqueadas en el punto de verificación G₁-S en tanto no estén listas para proseguir. Como se estudió en el capítulo 14, una de las mejores maneras de detener el ciclo celular por medio de *p53* es someter el DNA de las células a daño mediante radiaciones. Este tratamiento estimula a la célula a producir proteína *p53*, que detiene el ciclo celular en tanto se repara el daño al DNA. En realidad, los datos recientes sugieren que *p53* puede desempeñar un papel directo en la estimulación del proceso de reparación del DNA.

Los estudios indican que además de retrasar el ciclo celular y posiblemente participar en la reparación del DNA, *p53* también puede dirigir a las células a lo largo de un camino que conduce a muerte por apoptosis. Por ejemplo, cuando un gen *p53* normal se reintroduce en una célula cancerosa que ha perdido ambas copias de *p53*, la célula manipulada genéticamente casi siempre responde por autodestrucción. Se cree que *p53* desencadena la apoptosis en células que sufren daños del DNA ya imposibles de reparar o están alteradas de alguna manera, lo que las hace candidatas para desarrollar un tumor.

Son tantas las diferentes funciones atribuidas a *p53* que se conoce como "guardián del genoma". Según este concepto, cuando se inactivan ambas copias de *p53*, las células capaces de sobrevivir carecen de la integridad genética necesaria para permanecer saludables (fig. 16-15). Sin la salvaguarda de *p53* en su sitio, las células son genéticamente inestables y acumulan daño genético cada vez mayor, lo que las conduce a un fenotipo crecientemente maligno. La inactivación de *p53* también explica por qué las células cancerosas muestran exposición extravagante de los cromosomas, incluyendo cromosomas extra y redistribución de los cromosomas, que nunca se observa en células normales, sin afectar su capacidad para sobrevivir y proliferar (fig. 16-4).

Después de todo lo dicho acerca del gran número de papeles de *p53*, se podría pronosticar que un embrión que carece de ambas copias de este gen no puede llegar muy lejos. Sin embargo, este no es el caso, puesto que ratones que carecen totalmente de un gen *p53* (*p53*^{-/-}, ratones knockout) pueden desarrollarse a término y nacer con un fenotipo normal. Entonces, es claro que el gen *p53* no es indispensable para regular el proceso normal relacionado con crecimiento y división o diferenciación celular en un ratón. Después de varias semanas de vida, sin embargo, estos animales comienzan a presentar tumores malignos cuyas células casi siempre se caracterizan por un número anormal de cromosomas. Este dato apoya claramente el papel propuesto de *p53* de suprimir la formación de tumores y mantener la estabilidad genética aun en animales de corta vida, como los ratones.

Los ratones *p53*^{-/-} también suministran información acerca del papel de *p53* en la apoptosis. Cuando se colocan en cultivo linfocitos procedentes de glándulas de timo inmaduras de un ratón normal, responden a dosis baja de



(a)



(b)

FIGURA 16-14. Residuos aminoácidos mutados con mayor frecuencia en p53 de tumores humanos. a) Mapa de la frecuencia de mutaciones de p53 del dominio central. La secuencia de aminoácidos está indicada con nomenclatura de una sola letra (fig. 2-26). Los residuos subrayados son los más altamente conservados en la proteína de diferentes especies. El número de mutaciones sin sentido derivadas del tumor en cada residuo está indicado por la altura de las barras. Se identifican los seis residuos que sufren mutaciones con mayor frecuencia. Las flechas y los cilindros representan las cadenas β y las hélices α . b) Dibujo de listón que muestra la estructura tridimensional de la parte del polipéptido p53 cuya frecuencia se indica en la parte a y su interacción con la hélice de DNA. Los residuos mutados con mayor frecuencia en el cáncer humano ocurren en la interfase proteína-DNA o cerca de ella. (Reimpreso con autorización de Y. Cho, S. Gorina, P.D. Jeffrey y N.D. Pavletich, Science 265:352, 1994; copyright 1994 American Association for the Advancement of Science.)

radiación nociva para DNA sufriendo apoptosis. Por lo contrario, los linfocitos tomados de ratones knockout $p53^{-/-}$ sometidos al mismo tipo de radiación no responden con autodestrucción. Estos resultados confirman la hipótesis planteada anteriormente de que el control del daño al DNA requiere un gen $p53$ funcional, encargado de que las células que contienen lesiones en el DNA sigan una vía que conduce a la apoptosis.

Dada su capacidad para desencadenar la apoptosis, el gen $p53$ puede desempeñar un papel crucial en el tratamiento del cáncer mediante radiación y quimioterapia. En general, se asume que las células cancerosas son más susceptibles que las normales a fármacos y radiación debido a que las células cancerosas se dividen con mayor rapidez. Pero con frecuencia las células cancerosas se dividen más lentamente que sus contrapartes normales, pero aun así son más susceptibles a fármacos y radiación. Una teoría alterna-

tiva sugiere que las células normales resisten más los fármacos o las radiaciones, porque una vez que sufren daño genético, tal vez detengan su ciclo celular en tanto se repara dicho daño. Por lo contrario, las células cancerosas que han sufrido daño genético tienen mayor probabilidad de sufrir apoptosis en tanto posean un gen $p53$ funcional. Si las células cancerosas pierden la función $p53$, no pueden sufrir apoptosis y se vuelven mucho más resistentes a tratamiento adicional (fig. 16-16). Esta quizá sea la principal razón de que los tumores cuyas células carecen de un gen $p53$ funcional respondan muy poco a la radiación y a la quimioterapia en comparación con tumores que poseen una copia del tipo nativo del gen.

Funciones en colaboración de RB y $p53$. Ahora que hemos analizado los mecanismos mediante los cuales se cree que actúan dos genes supresores de tumor, RB y $p53$, podemos

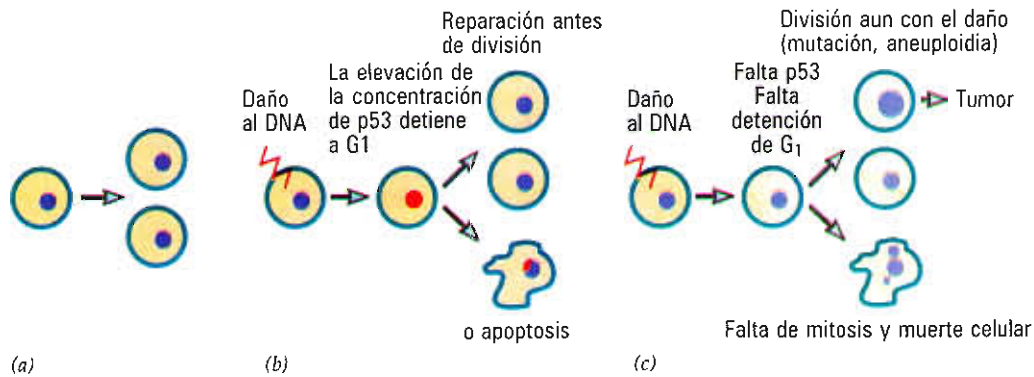


FIGURA 16-15. Modelo de la función de p53. a) Normalmente la división celular no requiere la participación de p53. b) Sin embargo, si el DNA de una célula se daña como consecuencia de la exposición a mutágenos, la concentración de p53 se eleva y actúa para detener la progresión de la célula a través de la fase G₁ o para dirigir la célula hacia la apoptosis. c) Cuando se inactivan ambas copias del gen p53, las células pierden la capacidad para detener el ciclo celular o de que la célula cometa apoptosis después de daño al DNA. Como resultado, la célula muere por fallas en la mitosis o continúa proliferando con una dotación cromosómica anormal, que puede conducir a la formación de crecimiento maligno. (Según D.P. Lane, reimpresso con permiso de Nature 358:15, 1992. Copyright 1992, Macmillan Magazines Ltd.)

ver de qué manera los productos de estos dos genes actúan en conjunto como armas antitumorales. Reconsideraremos brevemente el fenotipo del cristalino en los ratones *RB*^{-/-} knockout descritos anteriormente. Hicimos notar que a diferencia de las células del cristalino normal, las células de ratones deficientes *RB* no se detienen en la fase G₁ del ciclo celular, y en vez de diferenciarse en las células fibrosas del cristalino mueren por apoptosis. Hemos visto cómo *p53* codifica una proteína que puede dirigir a una célula anor-

mal a lo largo de una vía que conduce a la autodestrucción. Por lo tanto, sería de esperar que *p53* fuera encargada de que las células del cristalino *RB*^{-/-} sufran apoptosis. Esta posibilidad fue sometida a prueba recientemente en ratones con doble deficiencia en ambos tipos de genes supresores de tumor (ratones *RB*^{-/-}, *p53*^{-/-}). El examen del cristalino en desarrollo de estos ratones doblemente knockout revela el fenotipo preciso pronosticado en los comentarios precedentes. Debido a la falta de un gen *RB*, estas células no

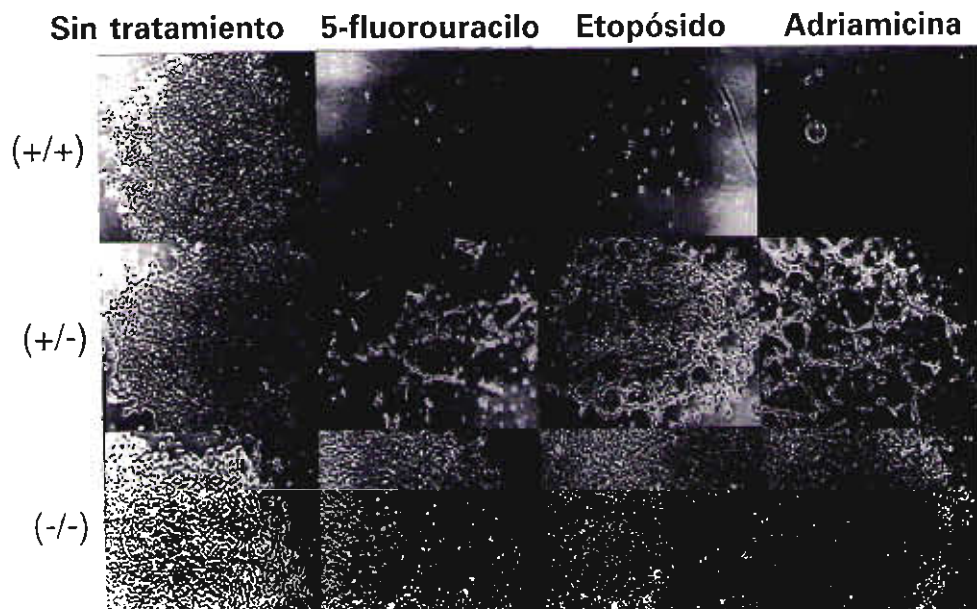


FIGURA 16-16. Demostración experimental del papel de p53 en la supervivencia de células tratadas con agentes quimioterapéuticos. Se cultivaron células de ratón que tenían dos copias de un gen funcional *p53* (línea de arriba), una copia funcional del gen *p53* (línea de en medio), o carecían de una copia funcional del gen (línea de abajo). Los cultivos de cada uno de estos tipos de células se desarrollaron en ausencia de un agente quimioterapéutico (primera columna) o en presencia de alguno de los tres compuestos indicados en la parte superior de las otras tres columnas. Es evidente que los compuestos tienen un efecto espectacular para detener el crecimiento e inducir la muerte celular (apoptosis) en células normales, en tanto que las células *p53*^{-/-} continúan proliferando en presencia de estos compuestos. (Según S.W. Lowe, H.E. Ruley, T. Jacks y D.E. Housman, Cell 74:959, 1993; con permiso de Cell Press.)

se detienen en G₁ y se diferencian, pero a causa de que también carecen de un gen *p53*, en vez de sufrir apoptosis continúan proliferando y finalmente forman tumores. Por lo tanto, al parecer estos dos genes actúan en colaboración para evitar la formación de tumores, y al parecer esta es la razón de que en muchas células tumorales se observan versiones mutadas de ambos genes.

Otra indicación de las actividades en colaboración de pRb y p53 proviene del estudio de virus DNA tumorales. Anteriormente se describió de qué manera estos virus codifican proteínas que se enlazan a pRb interfiriendo con su capacidad para mantenerse en E2F. Estos virus también codifican otra proteína cuya función es enlazarse a p53, inhibiendo su capacidad para actuar como factor de transcripción. Por lo tanto, para transformar una célula normal en una célula maligna, estos virus mantienen inactivos a ambos genes supresores de tumor. En realidad, cuando se infectan células con virus DNA tumoral cuyo p53 enlazado a proteína ha sufrido mutación, las células ya no pueden ser transformadas y en vez de ello sufren apoptosis. En estas condiciones, parecería que la proteína viral de tipo nativo que se enlaza a pRb provoca la entrada de las células a la fase S, pero la proteína p53 no inactivada por el virus mutante reconoce las condiciones de crecimiento anormal y lleva a cabo la autodestrucción de la célula.

Otros genes supresores de tumor. Las mutaciones en los genes *RB* y *p53* se relacionan con la formación de una gran variedad de procesos malignos en el hombre, pero las mutaciones en otros genes supresores de tumor sólo se descubren en unos pocos tipos de cáncer. Por ejemplo, algunos genes supresores de tumor de ordinario se encuentran inactivados en células provenientes de cáncer del colon. En Estados Unidos y Europa, el cáncer de colon, segundo cáncer más común entre individuos del sexo masculino (después del cáncer pulmonar) y tercero más común en mujeres (des-

pues de cáncer mamario y cáncer pulmonar) es resultado de la acumulación de mutaciones en varios genes diferentes (cuadro 16-3 y figura 16-9). Igual que con el gen *RB*, los genes supresores de tumor relacionados con cáncer de colon fueron identificados originalmente en estudios de genomas de miembros de familias con alto riesgo de desarrollar esta enfermedad.

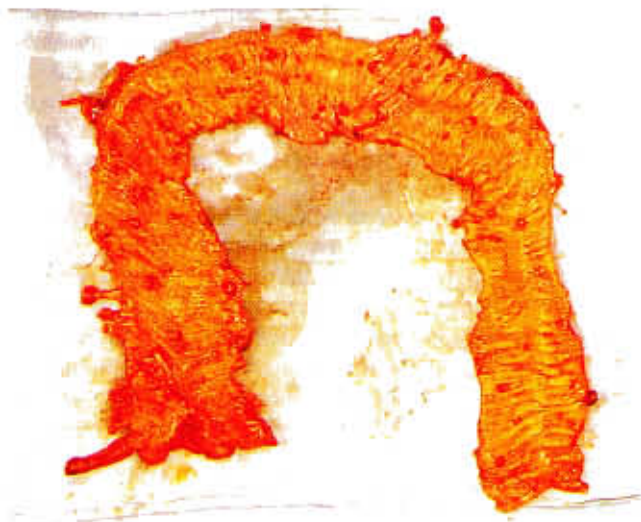
La poliposis adenomatosa coli (PAC) es una enfermedad hereditaria en la cual los individuos desarrollan un gran número de pólipos premalignos (adenomas) en las células epiteliales que revisten la pared del colon (fig. 16-17). Si no se eliminan, las células de estos pólipos tienen gran probabilidad de progresar hasta una etapa totalmente maligna. Se observó que las células de pacientes con esta enfermedad contienen supresión en una pequeña porción del cromosoma 5, la cual posteriormente se identificó como sitio del gen supresor de tumor llamado PAC. La persona que hereda supresión PAC se encuentra en posición similar a la que hereda supresión *RB*; si la segunda copia del gen se daña, se pierde la función protectora de dicho gen. Se supone que la pérdida de la segunda copia de PAC es causa de que la célula pierda algún aspecto del control de su crecimiento, lo que permite que la célula prolifere para formar pólipos. La conversión de las células del pólipo a un estado más maligno, caracterizado por su capacidad para provocar metástasis e invadir otros tejidos, al parecer se logra por acumulación de mutaciones adicionales, incluyendo mutaciones en *p53*. Aunque todavía no se determina la función de PAC, la mutación del gen no sólo se observa en cáncer de colon de personas con PAC, sino también en más de 50% de los tumores esporádicos del colon, lo que sugiere que el gen desempeña un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad.

Se estima que el cáncer mamario afecta aproximadamente a una de cada ocho mujeres que viven en Estados Unidos. De estos casos, casi 5% se presentan en familias

CUADRO 16-3. Genes alterados en el cáncer de colon

Gen	Cromosoma	Tumores con mutaciones	Clase	Acción
"CHNPC"	2	~15%	?	Mantiene la precisión durante la duplicación del DNA
K-Ras	12	~50%	Oncogen	Molécula de señal intracelular
Ciclinas	Varios	4%	Oncogen	Ayuda a regular el ciclo celular
neu/HER2	17	2%	Oncogen	Receptor de factor de crecimiento
mic	8	2%	Oncogen	Actividad reguladora del gen
PAC	5	>70%	Tumor supresor	Desconocida
DCC	18	>70%	Tumor supresor	Moléculas de adherencia celular
p53	17	>70%	Tumor supresor	Regula la actividad del gen

FUENTE: J. Marx, *Science* 260:752, 1993. Copyright 1993 American Association for the Advancement of Science.



(a)



(b)

FIGURA 16-17. Pólipos premalignos en el epitelio del colon humano. a) Fotografía de un colon extirpado de un paciente con síndrome de Gardner que muestra el patrón de formación de pólipos. Se observan patrones similares en el colon de personas con la enfermedad hereditaria de poliposis adenomatosa coli (PAC). b) Amplificación mayor de una porción del colon mostrado en a, con un patrón discreto de poliposis. (Cortesía de Randall W. Burt.)

cuyos miembros tienen mayor riesgo de padecer la enfermedad y se puede atribuir a la herencia de un gen que predispone al individuo a desarrollar cáncer mamario. La forma hereditaria de la enfermedad explica cerca de 25% de los casos diagnosticados antes de los 30 años de edad. Des-

pués de un esfuerzo intensivo efectuado en varios laboratorios, en 1994 se identificaron dos genes llamados *BRCA1* y *BRCA2* como causantes de la mayor parte de los casos hereditarios de cáncer mamario. *BRCA1* también predispone a las mujeres a desarrollar cáncer ovárico, que tiene una tasa de mortalidad especialmente elevada. Las secuencias de nucleótidos de estos genes relacionados demuestran que codifican polipéptidos que contienen motivos de dedos de zinc enlazados a DNA (pág. 520); esto sugiere que las proteínas codificadas actúan como factores de transcripción. En general, se supone que *BRCA1* y *BRCA2* son genes supresores de tumor, porque al parecer una mujer hereda un gen defectuoso (o supresión) y la otra copia del gen debe ser inactivada antes de que se desarrolle el tumor. Esto es una característica primaria de los genes supresores de tumor. Pero a diferencia de otros genes supresores de tumor, ninguno de los genes *BRCA* parece sufrir mutación en las formas esporádicas del cáncer. La razón de esta discrepancia todavía no se ha determinado.

Oncogenes

Como se describió anteriormente, los oncogenes codifican proteínas que promueven la pérdida de control del crecimiento y la conversión de una célula a un estado maligno. Se han identificado casi 100 oncogenes diferentes, muchos de ellos incluidos como parte del genoma de virus RNA tumorales, pero sólo en una docena de ellos se ha demostrado un papel en la carcinogénesis humana (cuadro 16-4). El oncogen implicado con mayor frecuencia en los tumores humanos es *ras*, que codifica una proteína (Ras) cuya función se describió en detalle en el capítulo 15 (pág. 649).

A diferencia de los genes supresores de tumor, en los cuales se ha comprobado que son causa de algunas formas hereditarias del cáncer, ningún tipo de trastorno se puede atribuir a un oncogen heredado (o sea, un protooncogen mutado). Por lo tanto, siempre que aparece un tumor, se supone que el oncogen se presenta como resultado de una mutación somática. Es posible que un oncogen hereditario conduzca a la muerte del embrión, lo que explicaría por qué dichos genes no se relacionan con la predisposición hereditaria a desarrollar cáncer. Muchos de los oncogenes conocidos codifican proteínas que tienen los siguientes tipos de funciones (fig. 16-18).

Oncógenes que codifican factores de crecimiento o sus receptores.

Los oncogenes se identificaron por primera vez como elementos del genoma de virus tumorales, según se expone en *La vía experimental* al final de este capítulo. La primera relación entre oncogenes y factores de crecimiento se estableció en 1983, cuando se descubrió que el virus del sarcoma del simio (SIS) causante de cáncer contenía un oncogen (*sis*) derivado del gen celular que codifica al factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), una proteína presente en la sangre humana. Las células cultivadas tratadas con este virus se convierten en cancerosas porque secretan grandes cantidades de FCDP en el medio, lo que provoca proliferación celular de manera descontrolada. Aunque se ha demostrado que FCDP se produce en células cancerosas extraídas de varios tumores humanos, todavía no está claro si es un factor causal de la carcinogénesis humana.

CUADRO 16-1. Protooncogenes y tumores humanos: algunas incriminaciones consistentes

Proto-oncogenes	Neoplasia(s)	Lesión
<i>abl</i>	Leucemia mielógena crónica	Translocación
<i>erbB</i>	Carcinoma de células escamosas; astrocitoma	Amplificación
<i>neu</i>	Adenocarcinoma mamario, ovárico y gástrico	Amplificación
<i>gip</i>	Carcinoma de ovario y de glándula suprarrenal	Mutaciones puntuales
<i>gsp</i>	Adenoma hipofisario, carcinoma tiroideo	Mutaciones puntuales
<i>mic</i>	Linfoma de Burkitt	Translocación
	Carcinoma de pulmón, glándula mamaria y cuello uterino	Amplificación
<i>L-mic</i>	Carcinoma de pulmón	Amplificación
<i>N-mic</i>	Neuroblastoma, carcinoma pulmonar de células pequeñas	Amplificación
<i>H-ras</i>	Carcinoma de colon, pulmón y páncreas; melanoma	Mutaciones puntuales
<i>K-ras</i>	Leucemia aguda mielógena y linfoblástica; carcinoma de tiroides, melanoma	Mutaciones puntuales
<i>N-ras</i>	Carcinoma genitourinario y tiroideo; melanoma	Mutaciones puntuales
<i>ret</i>	Carcinoma tiroideo	Redistribución
<i>ros</i>	Astrocitoma	?
<i>K-sam</i>	Carcinoma de estómago	Amplificación
<i>sis</i>	Astrocitoma	?
<i>src</i>	Carcinoma de colon	?
<i>trk</i>	Carcinoma tiroideo	Redistribución

FUENTE: J.M. Bishop, *Cell* 64:236, 1991, con permiso de Cell Press.

Se ha observado que otro virus oncogen, el virus de la eritroblastosis aviaria, es portador de un oncogen (*erbB*) que dirige la formación de un receptor FCE alterado, o sea, un receptor que ha perdido parte del dominio extracelular de la proteína que se enlaza al factor de crecimiento. Se podría esperar que el receptor alterado fuera incapaz de señalar a una célula en el momento de dividirse, pero ocurre justamente lo contrario. Esta versión alterada del receptor estimula en forma constitutiva a la célula, independientemente de la presencia o ausencia del factor de crecimiento en el medio. Esta es la razón de que las células cultivadas portadoras del gen alterado proliferen de manera descontrolada. Se ha observado que algunos tipos de cáncer humano espontáneo contienen células con alteraciones genéticas que afectan a receptores del factor de crecimiento. Con mayor frecuencia, las células malignas contienen un número mucho mayor de receptores en sus membranas plasmáticas en comparación con células normales. La presencia de un exceso de receptores provoca mayor sensibilidad de las células a concentraciones mucho menores de factor de crecimiento, y por lo tanto son estimuladas para dividirse en condiciones que no afectarían a células normales. Los protooncogenes que codifican a receptores para factores de

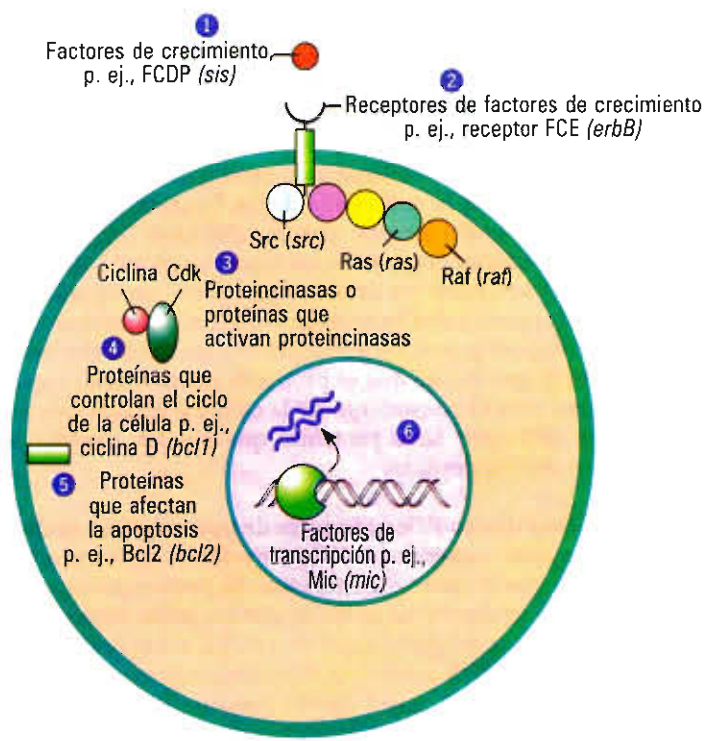


FIGURA 16-18. Diagrama que resume los tipos de proteínas codificadas por oncogenes. En estas se incluyen factores de crecimiento (1), receptores para factores de crecimiento (2), proteincinasas y las proteínas que las activan (3), proteínas que participan en el control del ciclo celular (4), proteínas que activan o inhiben la apoptosis (5), y proteínas enlazadas a DNA (6).

crecimiento también pueden activarse por mutaciones o translocaciones que inducen dimerización en receptores monómeros en ausencia de ligando exógeno, lo que conduce a la activación de la actividad de su proteincinasa (fig. 15-25).

Oncogenes que codifican proteincinasas citoplásmicas.

Algunas proteincinasas citoplásmicas, incluyendo serintreonincinasas y tirosincinasas, se incluyen en la lista de oncogenes. Por ejemplo, Raf es una serintreonincinasa que se sitúa a la cabeza de la cascada cPAM, la vía primaria para el control del crecimiento en muchas células. Es evidente que Raf se encuentra en buena posición para causar estragos dentro de una célula cuya actividad enzimática debe alterarse como resultado de una mutación en el gen *raf*. Igual que con los receptores de factor de crecimiento y Ras, las mutaciones que convierten a *Raf* en una enzima que siempre permanece en la posición "activa" tiene mayor probabilidad de convertir el protooncogen en un oncogen y contribuir a que la célula pierda el control de su crecimiento.

El primer oncogen descubierto, *src*, también es una proteincinasa, pero fosforila residuos de tirosina sobre sustratos de proteína, en vez de residuos de serina o treonina. La transformación de una célula por un *src* contenido en el virus tumoral se acompaña de la fosforilación de una gran

variedad de proteínas. Entre los aparentes sustratos de la proteína Src se incluye entre un gran número de proteínas que participan en la transducción de señales (incluyendo proteínasas y proteínas G heterotriméricas, pág. 634), proteínas implicadas en el control de la configuración del citoesqueleto y proteínas que participan en la adhesión celular. Dada la naturaleza de las funciones afectadas, no es difícil entender por qué una proteína Src alterada puede ser carcinógena, pero las mutaciones *src* sólo aparecen rara vez entre los cambios genéticos encontrados en las células tumorales humanas. Además, los ratones que han perdido el gen *src* no muestran efectos obvios del crecimiento, lo que indica que el producto del gen no es indispensable para el crecimiento de la célula y sugiere que las células contienen otras proteínas que pueden efectuar la función del Src perdido.

Oncogenes que codifican factores de transcripción nucleares. Algunos oncogenes codifican proteínas cuya estructura indica que actúan como factores de transcripción, pero todavía no se identifican con claridad los genes cuya expresión controlan. La progresión de células a través del ciclo celular requiere la activación coordinada (y represión) de gran variedad de genes cuyos productos contribuyen de diferente manera al crecimiento y división celular. Por lo tanto, no es sorprendente que las alteraciones de proteínas que controlan la expresión de estos genes puedan modificar gravemente a los patrones de crecimiento normal de la célula. Tal vez el oncogen mejor estudiado cuyo producto se cree que actúa como factor de transcripción sea *myc*.

En la página 582 se hizo notar que las células que no se encuentran en crecimiento o división activa tienden a salirse del ciclo celular y entrar a una etapa conocida como G_0 , de la cual pueden ser recuperadas. La proteína Myc normalmente es una de las primeras proteínas que aparecen cuando una célula en esta etapa de reposo se estimula para reingresar al ciclo celular y dividirse por adición de factores de crecimiento al medio. Myc continúa sintetizándose en tanto las células se sigan dividiendo, lo que sugiere que la proteína participa en la continuación de la proliferación celular. Cuando se bloquea selectivamente la expresión de *myc* utilizando oligonucleótidos contra sentido, se bloquea la progresión de la célula a través de G_1 .

Uno de los oncogenes alterados en el cáncer humano es *myc*, que con frecuencia se observa amplificado o redispuesto dentro del genoma como resultado de una inversión o translocación de cromosomas. Se cree que estos cambios cromosómicos apartan el gen *myc* de sus influencias reguladoras normales e incrementan su nivel de expresión celular, produciendo un exceso de proteína Myc. Dado su papel en la promoción del avance del ciclo celular, se ha sugerido que la sobreexpresión de *myc* pueden causar que las células continúen proliferando porque superan las influencias inhibitorias ejercidas por los productos de genes supresores de tumor, como pRb y p53.

Uno de los tipos más comunes de cáncer entre los pobladores de África, llamado linfoma de Burkitt, ocurre como resultado de la translocación de un gen *myc* a la posición adyacente a un gen que codifica una cadena de polipéptidos de una molécula de anticuerpo. Se cree que la activa-

ción que da como resultado la expresión del gen *myc* inicia el proceso maligno. En África, la enfermedad se presenta principalmente en personas que se han infectado con el virus de Epstein-Barr parecido al del herpes. Por alguna razón, este mismo virus sólo provoca infecciones menores (p. ej., mononucleosis) en personas que viven en países occidentales y no se acompaña de tumorigénesis.

Oncogenes que codifican productos que afectan la apoptosis. La apoptosis puede ser uno de los mecanismos claves del cuerpo para librarse por sí mismo de células tumorales en etapa temprana de su avance hacia la malignidad. Si esta afirmación es cierta, entonces toda alteración en una célula que tienda a disminuir la capacidad de la misma a la autodestrucción sería de esperar que aumente la probabilidad de que una célula produzca un tumor. El oncogen más estrechamente vinculado con la apoptosis es *bcl-2*, que codifica una proteína enlazada a membrana que normalmente actúa para inhibir la apoptosis en estos tejidos.

El papel de *bcl-2* en la apoptosis se nota con mayor claridad en los fenotipos de los ratones knockout que carecen del gen *bcl-2*. Una vez formado, el tejido linfático de estos ratones sufre regresión espectacular como resultado de una apoptosis ampliamente propagada. Igual que el *myc*, el producto del gen *bcl-2* se convierte en oncogénico cuando se expresa a niveles más elevados que lo normal, como puede ocurrir cuando el gen se transloca a un sitio anormal sobre el cromosoma. Ciertos tipos de cáncer linfático humano (llamados linfomas foliculares de células B) se correlacionan con la translocación del gen *bcl-2* a la proximidad de un gen que codifica la cadena pesada de moléculas de anticuerpos. Se ha sugerido que la sobreexpresión del gen *bcl-2* conduce a suprimir la apoptosis en los tejidos linfáticos, permitiendo proliferar a las células anormales para formar tumores linfáticos. *Bcl-2* también puede participar en la disminución de la eficacia de las sustancias quimioterapéuticas manteniendo vivas y con capacidad de proliferar a células dañadas por los fármacos.

Genes que promueven la formación de tumores a través de efectos secundarios sobre otros genes

Si consideramos que el cáncer es una enfermedad conocida por alteraciones en el DNA de células somáticas, entonces se dice que toda actividad que incremente la frecuencia de mutaciones genéticas probablemente aumente el riesgo de desarrollar cáncer. En el capítulo 13 se describió de qué manera los nucleótidos incorporados incorrectamente durante la duplicación son eliminados selectivamente de las cadenas recién sintetizadas mediante un proceso llamado reparación de las desigualdades (pág. 569). La reparación de desigualdades requiere la acción coordinada de varias proteínas, incluyendo aquellas que reconocen la lesión, que eliminan una parte de la cadena que contiene la lesión, y que sustituyen el segmento equivocado con nucleótidos complementarios. Si alguna de estas proteínas es defectuosa, sería de esperar que la célula afectada muestre una tasa elevada anormal de mutaciones, lo que a su vez incrementa el riesgo de malignización.

La primera gran demostración de que un defecto en la reparación de desigualdades podía ser un factor en el desa-

rollo de cáncer fue dada a conocer en 1993 a partir de estudios efectuados en células de pacientes con la forma hereditaria más común de cáncer de colon, llamada cáncer hereditario no poliposo de colon (CHNPC) para distinguirlo del tipo que forma pólipos descrito anteriormente. El gen defectuoso causante de CHNPC se encuentra en casi 0.5% de la población y explica hasta 15% de los casos de cáncer de colon. En la página 406, se hizo notar que el genoma contiene un gran número de secuencias DNA repetitivas muy cortas llamadas microsatélites. El análisis de DNA de personas con CHNPC revela que los microsatélites de las células tumorales con frecuencia son de longitud diferente en comparación con la secuencia correspondiente en el DNA de células normales. Se podrían esperar estas variaciones en el DNA de individuo diferentes, pero no en el DNA de células diferentes de la misma persona.

Los cambios de longitud de una secuencia microsatélite se deben a errores durante la duplicación cuando la cadena plantilla copiada y la nueva cadena que se sintetiza se deslizan en cuanto a sus posiciones relativas entre sí. Este tipo de deslizamiento ocurre con mayor frecuencia en regiones que contienen secuencias cortas altamente repetidas. Según la dirección del deslizamiento, la cadena recién sintetizada

contiene nucleótidos adicionales o falta de nucleótidos en comparación con la cadena plantilla. La diferencia de longitud en la secuencia de nucleótidos de las dos cadenas genera una pequeña asa de DNA donde no se forman pares en el dúplex hija, que normalmente se reconocen por enzimas reparadoras de desigualdades y la reparación efectuada. Este dato sugiere que una deficiencia en el sistema de reparación de desigualdades puede ser la causa del desarrollo de estos tipos de cáncer hereditario. El apoyo de esta hipótesis proviene de estudios sobre el DNA y las células de personas con CHNPC. En tanto los extractos de células normales puedan efectuar la reparación de desigualdades *in vitro*, los extractos de células tumorales CHNPC presentan defectos de reparación. El análisis del DNA de un gran número de personas con HNPCC revela supresiones o mutaciones debilitantes en algunos de los genes que codifican proteínas para establecer la vía DNA para reparación de desigualdades. Las células incapaces de reparar apropiadamente los sitios que contienen asas de una sola cadena o nucleótidos mal apareados, pueden acumular mutaciones secundarias a través de todo el genoma, incluyendo alteraciones que inactivan genes supresores de tumor y oncogenes activados. Estas células se encuentran en mucho

LA VIA EXPERIMENTAL

El descubrimiento de los oncogenes

En 1911, Peyton Rous, del Rockefeller Institute for Medical Research, publicó un trabajo de menos de una página de extensión (compartió la página con una nota acerca del tratamiento de la sífilis) y prácticamente no tuvo impacto en la comunidad científica. Pero en este trabajo se publicó una de las observaciones más perspicaces en el campo de la biología celular y molecular.¹ Rous había estado trabajando con un sarcoma de pollo que se podía transmitir de una gallina a otra inoculando a un huésped de la misma cepa con pedazos de tejido tumoral. En el trabajo de 1911, Rous describió una serie de experimentos que sugerían fuertemente que el tumor se podía transmitir de un animal a otro mediante un "virus filtrable", término acuñado unos 10 años antes para describir agentes patógenos lo suficientemente pequeños para pasar a través de filtros impermeables a bacterias.

En este experimento, Rous extirpó los tumores de la pechuga de la gallina, molió las células en un mortero con arena estéril, centrifugó las partículas materiales para formar un pellet, eliminó el sobrenadante, y forzó el líquido sobrenadante a través de un filtro de porosidad variable incluyendo algunos de tamaño lo bastante pequeño para evitar el paso de bacterias. A continuación inyectó el filtrado en el músculo de la pechuga de una gallina receptora y observó que un porcentaje significativo de los animales inyectados desarrollaban tumor.

El virus descubierto por Rous en 1911 es un virus que contiene RNA. A fines del decenio de 1960 se encontraron virus similares relacionados con tumores mamarios y leucemia en roedores y gatos. Se han criado ciertas cepas de ratones que desarrollaron tumores específicos con frecuencia muy elevada. Se pudieron observar partículas virales que contienen RNA dentro de las células tumorales y también como yemas de la superficie celular, según se muestra en la micrografía de la figura VE 16-1. Es evidente que los tumores desarrollados en esta cepa pura se transmiten verticalmente, o sea, a través del óvulo fertilizado de la madre a la cría, de modo que los adultos de cada generación invariablemente desarrollan el tumor. Estos estudios suministraron pruebas de que el genoma viral se puede heredar a través de los gametos y transmitirse subsecuentemente de una célula a otra por medio de la mitosis sin mostrar efecto evidente alguno sobre la conducta de las células. La presencia de los genomas virales no es una peculiaridad de las cepas criadas en el laboratorio, puesto que se demostró que ratones salvajes (feral) tratados con carcinógenos químicos desarrollan tumores que a menudo contienen los mismos antígenos característicos de los virus tumorales RNA y muestran partículas virales al microscopio electrónico.

Una de las principales preguntas respecto de la transmisión vertical de los virus RNA tumorales era si el genoma viral

mayor riesgo de convertirse en malignas. La razón de que estas mutaciones conduzcan principalmente a cáncer de colon en oposición a otros tipos de cáncer todavía es un enigma.

Conclusiones importantes acerca de la genética del cáncer

Iniciamos este capítulo con un punto de vista pesimista acerca de los proyectos inmediatos para tratamiento del cáncer. Ahora que hemos estudiado algunos de los datos recientes acerca de las bases genéticas de la formación de tumores, podemos entender por qué la lucha contra el cáncer quizá requiera en último término que se deba alterar permanentemente la composición genética de las células de un tumor. Mientras tanto, se espera desarrollar algún otro tipo de tratamiento eficaz contra el cáncer sin recurrir a modificaciones genéticas. Es útil puntualizar que los conocimientos recién obtenidos acerca del papel de genes específicos en la tumorigénesis ha cambiado una perspectiva importante acerca del cáncer. Hace 10 años, una de las afirmaciones escuchadas con mayor frecuencia era que el cáncer consistía en grupo de enfermedades muy diferentes y

cada tipo de cáncer tal vez tuviera que ser tratado de manera particular. Hasta ahora hemos tenido la experiencia de que ciertos compuestos quimioterapéuticos son más adecuados para destruir un tipo de cáncer en comparación con otros. Pero el dato de que muchos tipos diferentes de cáncer comparten los mismos defectos genéticos, como alteraciones en *p53*, *RB*, *ras*, o todos juntos, nos hace recibir la esperanza de que muchos tipos de cáncer distintos pueden tratarse mediante una técnica común. Por ejemplo, si se pudiera desarrollar un fármaco que imite los efectos de las proteínas *p53* o *Ras*, entonces sería posible tratar una gran variedad de tipos de cáncer con el mismo agente.

La identificación de defectos genéticos específicos también plantea la posibilidad de desarrollar procedimientos de detección capaces de identificar personas que debido a ciertos alelos que poseen se encuentran en mayor riesgo de desarrollar algún tipo particular de cáncer. Puesto que cuanto más temprano se descubre un cáncer mayor es la probabilidad de supervivencia, estos procedimientos de detección podrían tener un impacto significativo en la disminución de la mortalidad debida a cáncer.



FIGURA VE 16-1. Micrografía electrónica del virus Friend de la leucemia murina surgiendo como una yema desde la superficie de una célula leucémica cultivada. (Cortesía de E. de Harven.)

se pasa de los padres a la descendencia como moléculas RNA libres o integradas de alguna manera al DNA de la célula huésped. Las pruebas indican que la infección y la transformación efectuadas por estos virus requieren la síntesis de DNA. Howard Temin, de la Universidad de Wisconsin, sugirió que la duplicación de los virus RNA tumorales podía ocurrir por medio de un DNA intermedio, un provirus, que entonces serviría como plantilla para la síntesis del RNA viral. Pero este modelo requiere una enzima única, una DNA polimerasa dependiente de RNA que nunca se ha encontrado en algún tipo de célula. Esta situación se modificó en 1970 cuando se descubrió una enzima con esta actividad independientemente por David Baltimore, del Massachusetts Institute of Technology, y por Temin y Satoshi Mizutani.^{2,3}

Baltimore examinó los viriones (partículas virales maduras) de dos virus RNA tumorales, virus Rauscher de la leucemia murina (VRLM) y el virus del sarcoma de Rous (VSR). Se incubó una preparación de virus purificada bajo condiciones que promueven la actividad de una DNA polimerasa, incluyendo Mg^{2+} (o Mn^{2+}), NaCl y ditioneitol (que evita la oxidación de los grupos -SH de la enzima), y los cuatro fosfatos desoxirribonucleósidos, uno de los cuales (TTP) se marcó con 3H . Se encontró que la preparación incorpora los precursores DNA marcados en un producto ácido insoluble (cuadro VE 16-1) que mostró las propiedades del DNA. Por ejemplo, el producto de la reacción se convirtió en ácido soluble (indicando que se había convertido a productos de bajo peso molecular) mediante tratamiento con la desoxirribonucleasa pancreática o la nucleasa microcócica, pero no fue afectado por la ribonucleasa pancreática o por la hidrólisis alcalina (a las cuales es sensible el RNA) (cuadro VE 16-2). Se encontró que la enzima sedimenta junto con las partículas virales maduras, lo

CUADRO VE 16-1. Propiedades de la DNA polimerasa del virus Rauscher de la leucemia murina

Sistema de reacción	pmoles ^3H -TMP incorporado en 45 min
Completo	3.31
Sin acetato de magnesio	0.04
Sin acetato de magnesio + 6 mM de MnCl_2	1.59
Sin ditiotritol	0.38
Sin NaCl	2.18
Sin dATP	<0.10
Sin dCTP	0.12
Sin dGTP	<0.10

FUENTE: D. Baltimore, reimpreso con permiso de *Nature* 226:1209, 1970. Copyright 1970, Macmillan Magazines Ltd.

que sugiere que forma parte del virión mismo y no es una enzima donada por la célula huésped. Aunque el producto fue insensible al tratamiento con la ribonucleasa pancreática, la plantilla fue muy sensible a esta enzima (fig. VE 16-2), en particular cuando se trató el virión previamente con la ribonucleasa antes de la adición de los otros componentes de la mezcla de reacción (fig. VE 16-2, curva 4). Estos resultados fortalecen la hipótesis de que el RNA viral suministra la plantilla para la síntesis de una copia del DNA, la cual presumiblemente sirvió como plantilla para la síntesis del RNAm viral requerido para la infección y la transformación. Estos experimentos no sólo sugieren que la transformación celular efectuada por un virus RNA tumoral procede a través de un DNA intermedio, sino también modificaron el antiguo concepto originalmente propuesto por Francis Crick conocido como el dogma central, que establece que la información en una célula *siempre* fluye del DNA al RNA y a la proteína. La DNA polimerasa dependiente de RNA se conoce como *transcriptasa inversa*.

Durante el decenio de 1970 la atención se volvió a la identificación de genes de virus tumorales que causan la transformación y al mecanismo de acción de los productos del gen. Las pruebas de análisis genéticos indican que se pueden aislar

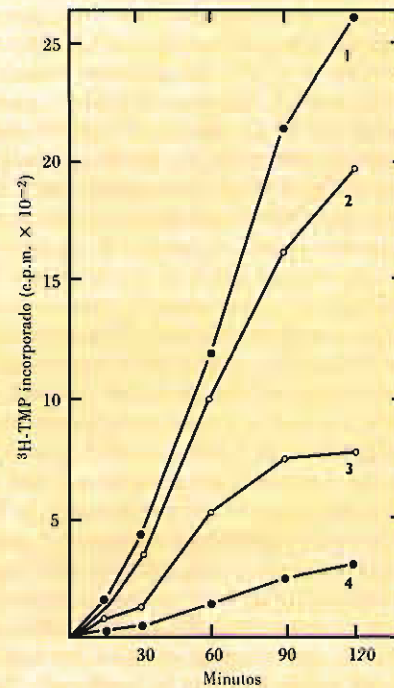


FIGURA VE 16-2. Incorporación de la radiactividad a partir de ^3H -TTP en un precipitado ácido insoluble por acción de la DNA polimerasa del virus Rauscher de la leucemia murina en presencia y ausencia de ribonucleasas. Curva 1, sin adición de ribonucleasa; curva 2, preincubación sin adición de ribonucleasa durante 20 minutos antes de añadir ^3H -TTP; curva 3, ribonucleasa añadida a la mezcla de reacción; curva 4, preincubación con ribonucleasa antes de añadir ^3H -TTP. (Según D. Baltimore, reimpreso con permiso de *Nature* 226:1210, 1970. Copyright 1970, Macmillan Magazines Ltd.)

cepas mutantes de virus que conservan la capacidad de crecer en células huésped, pero que son incapaces de transformar la célula en otra que muestre propiedades malignas.⁴ Por lo tanto, la capacidad de transformar una célula reside en una porción restringida del genoma viral.

Estos datos fueron el antecedente de una serie de trabajos publicados por Harold Varmus, J. Michael Bishop, Dominique Stehelin y sus colaboradores, de la Universidad de California,

CUADRO VE 16-2. Caracterización del producto de la polimerasa

Exper.	Tratamiento	Radiactividad insoluble en ácido	Porcentaje de producto no digerido
1	Sin tratamiento	1 425	(100)
	20 μg desoxirribonucleasa	125	9
	20 μg nucleasa microcócica	69	5
	20 μg ribonucleasa	1 361	96
2	Sin tratamiento	1 644	(100)
	NaOH hidrolizado	1 684	100

FUENTE: D. Baltimore, reimpreso con permiso de *Nature* 226:1210, 1970. Copyright 1970, Macmillan Magazines Ltd.

en San Francisco. Estos investigadores comenzaron aislando cepas mutantes del virus del sarcoma aviar (VSA) portador de supresiones de 10 a 20% del genoma, constituyendo un virus incapaz de inducir sarcoma en pollos y transformar fibroblastos en cultivo. El gen encargado de la transformación, que está ausente en estos mutantes, se conoce como *src* (para el sarcoma). Para aislar el DNA correspondiente a las regiones borradas, que al parecer son portadoras de los genes requeridos para la transformación, se empleó la siguiente estrategia experimental.⁵ Se empleó RNA de los genomas de viriones completos (oncógenos) como plantilla para la formación de una cadena única complementaria de DNA marcada con isótopo radiactivo (DNA_c) por medio de transcriptasa inversa. A continuación se hibridó el DNA_c marcado (presente como fragmentos) con RNA obtenido de uno de los mutantes con supresiones. Los fragmentos de DNA que no lograron hibridar al RNA representan porciones del genoma que han sufrido supresión a partir del mutante defectuoso para la transformación, y por lo tanto se supone que contienen el gen requerido por el virus para causar la transformación. Los fragmentos de DNA que no hibridan al RNA se pudieron separar de los que forman parte de híbridos DNA-RNA, permitiendo que la mezcla pase a través de una columna que contiene una sal particular de fosfato de calcio llamada hidroxiapatita (extraída de tejido óseo). Mediante esta estrategia básica, se aisló una secuencia de DNA conocida como DNA_{csrc}, que corresponde aproximadamente a 16% del genoma viral (1 600 de los 10 000 nucleótidos que constituyen toda la longitud del genoma).

Una vez aislado, el DNA_{csrc} demostró ser muy útil como sonda. Al menos se demostró que este DNA_c marcado puede hibridar al DNA extraído de varias especies de aves (gallinas, pavos, codornices, patos y avestruz australiana), lo que indica que los genomas celulares de estas aves contienen una secuencia de DNA estrechamente relacionada a *src*.⁶ Por lo contrario, en estos primeros experimentos no se descubrió homología entre DNA_{csrc} y el DNA de mamíferos (ratones y terneras). La cinética de la reacción entre los DNA de estas aves y el DNA_{csrc} indica que las secuencias complementarias están presentes como parte de fracciones no repetidas del genoma (pág. 425), y por lo tanto sólo se presentan una vez (o muy pocas veces) por conjunto haploide de DNA.

Estos datos suministraron la primera gran demostración de que un gen presente en un virus tumoral que causa transformación celular también está presente en el DNA de células normales (no infectadas) y por lo tanto al parecer es parte del genoma normal de las células. Estos resultados indican que los genes transformadores del genoma viral (oncogenes) no son verdaderos genes virales, sino más bien genes celulares captados por el RNA del virus tumoral durante una infección previa. Este gen entregado por la célula al parecer confiere al virus el poder de transformar a las mismas células en las cuales se encuentra normalmente dicho gen. El hecho de que la secuencia *src* se encuentre en todas las especies aviares estudiadas sugiere que la secuencia se ha conservado durante toda la evolución de las aves y, por lo tanto, se asume que gobiernan una actividad básica de las células normales.

En un estudio subsecuente se efectuó hibridación entre el DNA_{csrc} y el DNA celular procedente de varios animales bajo

condiciones estrictas, lo que permitió formar dúplex con un porcentaje considerable de bases formando pares incorrectos. En estas condiciones se observó que DNA_{csrc} puede enlazarse al DNA de todas las clases de vertebrados, incluyendo mamíferos, pero no al DNA del erizo de mar, la mosca de la fruta o bacterias. Una manera de determinar el grado de bases mal apareadas en los dúplex consiste en vigilar la temperatura a la cual se separan los complejos DNA-RNA (fusión). Cuanto más elevada la temperatura de fusión, mayor el porcentaje de pares de bases apropiadas (A-T y G-C). En el cuadro VE 16-3 se muestran los resultados de estos experimentos. Las reducciones de la temperatura de fusión sugieren 3 a 4% de pares de bases impropias entre DNA_{csrc} con DNA de pollos y otro 10% de pares de bases impropias con el DNA de otros vertebrados. Según estos resultados, es posible concluir que el gen *src* no sólo está presente en el RNA del genoma VSA y el genoma de las células de pollo que puede infectar, sino que también se encuentra un gen homólogo en el DNA de vertebrados evolutivamente distantes, lo que sugiere que desempeña alguna función crítica en las células de todos los vertebrados.⁷

Los resultados de estos experimentos plantearon muchas preguntas, algunas de mayor importancia, que fueron: 1) ¿Cuál es la función del producto del gen *src*? 2) ¿De qué manera la presencia del gen viral *src* (referido como *v-src*) altera la conducta de una célula normal que ya posee una copia del gen (conocida como *c-src*)?

El producto del gen *src* inicialmente fue identificado por Ray Erikson y sus colaboradores, de la Universidad de Colorado, por medio de dos procedimientos independientes: 1) precipitación de la proteína contenida en extractos de células transformadas por anticuerpos preparados a partir de animales infectados con VSR, y 2) síntesis de la proteína en un sistema sintetizador de proteína libre de células empleando el gen viral aislado como plantilla. A través de estos procedimientos se encontró que el producto del gen *src* es una proteína de 60 000 daltons, a la cual se le dio el nombre pp60^{src}.⁸ Cuando la proteína pp60^{src} se incubó con ³²P-ATP, se transfirieron grupos fosfato radiactivos a las cadenas pesadas de las moléculas del anticuerpo relacionado (IgG) empleado en la inmunoprecipitación. Este dato sugiere que el gen *src* codifica una enzima que posee actividad de proteínasa.⁹ Se obtuvieron datos para confirmar estos estudios de la proteína producida por un mutante del VSA sensible a temperatura capaz de transformar células cuando crecen a 35°C pero no a 41°C. Las pruebas indican que el producto del gen *src* codificado por estos mutantes se desnaturaliza irreversiblemente a la temperatura más elevada. Para estudiar la actividad del producto del gen mutante *src* se infectaron cultivos paralelos de células de pollo con el mutante (designado NY68) o con el virus no defectuoso (designado nd), y se desarrollaron las células a 41°C o a 35°C (cuadro VE 16-4). De cada uno de los cuatro cultivos se prepararon extractos de células, la proteína pp60^{src} fue inmunoprecipitada y el precipitado se analizó en busca de actividad de proteínasa. En el cuadro VE 16-4 se puede ver que, en tanto la proteína inmunoprecipitada codificada por el virus no defectuoso mostró elevada actividad de proteínasa a 41°C, la misma proteína de la cepa sensible a temperatura mostró actividad muy disminuida. Estos datos suministraron mayo-

CUADRO VE 16-3. Estabilidad térmica de los dúplex entre DNAs_{src} y DNA celular

DNA	% DNA _{src} en los dúplex	t_m	Δt_m
XC*	65	79	0
Pollo	55	74.5	-4.5
Hombre	29	66.5	-12.5
Ternera	24	65	-14
Ratón	28	65.5	-13.5
Salmón	19	66.5	-12.5

* Las células XC son células de ratas infectadas que contienen casi 20 copias del genoma del virus del sarcoma aviario. El DNA XC y el DNAs_{src} deben contener secuencias que son precisamente complementarias, de modo que la hibridación de estos dos DNA suministra un estándar interno en cada análisis.

FUENTE: D.H. Spector, H.E. Varmus y J.M. Bishop, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:4105, 1978.

res pruebas acerca de que el producto *src* es la proteincinasa. Cuando se fijaron células infectadas con VSA, se practicaron cortes y se incubaron con anticuerpos marcados con ferritina contra la proteína pp60^{src}, los anticuerpos se localizaron sobre la superficie interna de la membrana plasmática, lo que sugiere una concentración del producto del gen *src* en esa parte de la célula (fig. VE 16-3).¹⁰

Estos fueron los primeros estudios para dilucidar la función de un oncogen. Una proteincinasa es el tipo de producto del gen que sería de esperar tuviera posibilidad de actividad transformadora porque puede regular las actividades de un gran número de otras proteínas, cada una de las cuales sirve a una función crítica en una u otra actividad relacionada con el crecimiento de la célula. Análisis posteriores del papel del producto del gen *src* revelaron un dato inesperado. A diferencia de todas las proteincinasas cuya función se había estudiado, la proteína pp60^{src} transfirió grupos fosfato a residuos de tirosina sobre la proteína sustrato en vez de hacerlo sobre residuos de serina o treonina.¹¹ La existencia de residuos de tirosina fosforilados no se había descubierto previamente porque los

CUADRO VE 16-4. Incremento dependiente de temperatura de la actividad fosforilante de la proteína *src* inmunoprecipitada en células de pollo infectadas con un mutante de transformación ts del VSA

Virus	Temperatura de crecimiento (°C)	Actividad fosforilante
		³² P incorporado (fmol/mg proteína)
SR-VSA (nd)	35	16.6
SR-VSA (nd)	41	35.8
SR-NY68	35	19.8
SR-NY68	41	1.7

FUENTE: M.S. Collet y R.L. Erikson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:2023, 1978.

**FIGURA VE 16-3.** Micrografía electrónica de un corte a través de un par de fibroblastos adyacentes tratados con anticuerpos marcados con ferritina contra la proteína pp60^{src}. La proteína se encuentra localizada (según lo revelan los gránulos densos de ferritina) en la membrana plasmática de la célula y particularmente concentrada en los sitios de uniones de abertura. (Según Mark C. Willingham, Gilbert Jay e Ira Pastan, *Cell* 18:128, 1979, con permiso de Cell Press.)

residuos de serina y treonina fosforilados son aproximadamente 3 000 veces más abundantes en las células y porque los residuos de fosfotreonina y fosfotirosina son difíciles de separar por los procedimientos tradicionales de electroforesis. No sólo el producto del gen viral *src* (*v-src*) codifica una tirosincinasa, sino también la sintetiza la versión celular del gen *c-src*. Sin embargo, el número de residuos de tirosina fosforilados en las proteínas de células RSV transformadas es aproximada-

mente ocho veces mayor que en las células testigo. Este dato sugiere que la versión viral del gen puede inducir transformación porque funciona a nivel de actividad más alto que la versión celular. La fosforilación de residuos de tirosina adicionales en las proteínas celulares se supone que es indispensable para la transformación maligna de las células efectuada por el virus del sarcoma de Rous. Todavía debe determinarse si los productos de los genes *v-src* y *c-src* son o no equivalentes funcionalmente.

Los resultados del estudio del VSR suministraron datos preliminares de que un incremento en la actividad del producto de un oncogen podía ser la clave para convertir a una célula normal en célula maligna. Pronto se demostró que el fenotipo maligno también podía ser inducido por un oncogen que contiene una secuencia alterada de nucleótidos. El estudio fundamental en este sentido fue realizado por Robert Weinberg y sus colegas, del Massachusetts Institute of Technology, utilizando la técnica de transfección de DNA (sección 17-12).¹²

Weinberg inició los estudios obteniendo 15 diferentes estirpes de células malignas derivadas de células de ratón tratadas con una sustancia química carcinógena. Así, estas células se habían convertido en malignas sin exponerlas a virus. El DNA de cada una de estas estirpes celulares se extrajo y utilizó para transfectar un tipo de fibroblasto de ratón no maligno llamado célula NIH3T3. Las células NIH3T3 se seleccionaron para estos experimentos porque captan DNA exógeno con gran eficiencia y se transforman rápidamente en células malignas en cultivo. Después de la transfección con el DNA de las células tumorales los fibroblastos se desarrollaron *in vitro*, y los cultivos fueron estudiados en busca de la formación de grumos (focos) que contienen células transformadas por el DNA añadido. De las 15 estirpes celulares probadas, cinco de ellas produjeron DNA capaz de transformar a las células NIH3T3 receptoras. El DNA de las células normales carece de esta capacidad. Estos resultados demostraron que las sustancias químicas carcinógenas producen alteraciones en la secuencia de nucleótidos de genes que confieren a los genes alterados la capacidad para transformar otras células. Así, los genes celulares se podían convertir en oncogenes de dos maneras diferentes: como resultado de su incorporación al genoma de un virus o por alteración mediante carcinógenos químicos.

Hasta este punto, prácticamente todos los estudios acerca de genes causantes de cáncer se habían efectuado en ratones, pollos y otros organismos cuyas células eran muy susceptibles a la transformación. En 1981, la atención se tornó hacia el cáncer humano cuando se demostró que el DNA aislado de células tumorales humanas tenía capacidad de transformar a las células NIH3T3 de ratones después de la transfección.¹³ De los 26 diferentes tipos de tumores humanos ensayados en este estudio, dos suministraron DNA capaz de transformar a los fibroblastos receptores de ratón. En ambos casos el DNA se extrajo de estirpes celulares procedentes de carcinoma de vejiga (identificados como EJ y J82). Se emprendieron grandes esfuerzos para determinar si los genes se derivan de virus tumorales, pero no se encontraron datos de DNA viral en estas células. Estos resultados proporcionaron la primera demostración de que algunas células de cáncer humano contienen un

oncogen activado que se puede transmitir a otras células y causar su transformación.

El conocimiento de que el cáncer se puede transmitir de una célula a otra mediante fragmentos de DNA suministró una base para determinar qué genes de una célula, cuando son activados por mutación o por algún otro mecanismo, se encargan de provocar la malignización de la célula. Para efectuar esta determinación fue necesario aislar el DNA que cuando se capta causa la transformación de la célula. Una vez aislado el DNA extraño causante de la transformación se pudo analizar la presencia de alelos causantes de cáncer. En 1982, en plazo de dos meses, tres laboratorios diferentes comunicaron el aislamiento y clonación de un gen hasta entonces no identificado en células del carcinoma de vejiga humana capaces de transformar fibroblastos NIH3T3 de ratón.¹⁴⁻¹⁶ En uno de estos estudios, el DNA clonado capaz de transformar células se utilizó para examinar DNA humano normal en busca de la presencia de secuencias homólogas.¹⁵ Se descubrió que el DNA aislado de fibroblastos humanos normales contiene un fragmento de DNA que hibrida con la sonda oncogen del carcinoma de vejiga. Este dato indica que el DNA humano normal contiene una secuencia muy similar, hasta en lo más mínimo, a la secuencia que activa el oncogen, por lo que es un argumento contra la posibilidad de que la secuencia entre a la célula por infección viral. Cuando se comparó la susceptibilidad a la restricción enzimática de los dos DNA, del gen transformador, aislado de las células del carcinoma vesical humano y del gen homólogo aislado de fibroblastos humanos normales, no se encontraron diferencias en las posiciones de los sitios de restricción, lo que indica que si hay diferencias entre las dos versiones del gen, deben ser muy sutiles. Estos resultados suministran fuerte apoyo a la proposición de que las células cancerosas se originan como resultado de alteraciones en genes celulares preexistentes (o sea protooncogenes) que los convierten en genes activos causantes de cáncer (oncogenes).

En 1982 se habían identificado varios genes virales transformadores, cada uno de los cuales se demostró que tenía un homólogo celular. Una vez aislado y clonado el gen transformador de las células del cáncer de vejiga humana, el siguiente paso lógico era determinar si este gen muestra alguna relación con los oncogenes de los virus RNA tumorales. Una vez más, en plazo de dos meses se publicaron tres trabajos de diferentes laboratorios comunicando resultados similares.¹⁷⁻¹⁹ Las tres publicaciones demostraron que el oncogen capaz de transformar células NIH3T3 es el mismo oncogen (denominado *ras*) que se encuentra en el virus del sarcoma de Harvey, el cual es un virus RNA tumoral murino. Las comparaciones preliminares de las dos versiones de *ras*, la versión viral y su homólogo celular, no mostraron diferencia alguna, lo que indica que los dos genes son muy similares o idénticos. Estos datos sugirieron que el cáncer que se desarrolla espontáneamente en la población humana se debe a una alteración genética similar a los cambios que ocurren en las células transformadas en el laboratorio por medio de virus. Es importante hacer notar que los tipos de cáncer inducidos por el virus del sarcoma de Harvey (sarcomas y eritroleucemias) son muy diferentes de los tumores de vejiga, cuyo origen es epitelial. Esta fue la primera indicación de que las alteraciones en el mismo gen, el *ras*, pueden

provocar el desarrollo de una amplia gama de tumores diferentes.

A fines de 1982 se publicaron tres trabajos más de diferentes laboratorios acerca de los cambios precisos en el gen *ras* que lo activan para convertirse en oncogen.²⁰⁻²² La comparación de fragmentos de DNA de restricción preparados a partir de células malignas y células normales indica que la activación de *ras* no significa cambios burdos en el DNA. Luego de ubicar con precisión la sección del fragmento de DNA grande causante de la transformación, está indicado el análisis de la secuencia de nucleótidos activada por el DNA de células vesicales malignas como resultado de la sustitución de una sola base dentro de la región codificante del gen. Es notable que las células de ambos tipos de carcinoma vesical estudiados (identificados como EJ y T24) contienen precisamente la misma alteración: un nucleótido que posee guanina en un sitio específico del DNA del protooncogen es sustituida por una timidina en el oncogen activado. Esta sustitución de bases da como resultado el reemplazo de una valina por una glicina como el residuo aminoácido número 12 del polipéptido.

La determinación de la secuencia de nucleótidos del gen *v-ras* del virus del sarcoma de Harvey reveló una alteración en la secuencia de bases que afecta precisamente al mismo codón modificado en el DNA del carcinoma de vejiga humana. El cambio en el gen viral consiste en sustituir la glicina normal por una arginina. Es evidente que este residuo glicina particular desempeña un papel crítico en la estructura y función de esta proteína. Es interesante hacer notar que el gen *ras* es un protooncogen, el cual, igual que *src*, se puede activar por unión a un promotor viral. Por lo tanto, *ras* puede ser activado para inducir la transformación a través de dos vías totalmente diferentes: incrementando su expresión o alterando la secuencia de aminoácidos del polipéptido que codifica.

La investigación descrita en *La vía experimental* actual significa un gran paso hacia adelante en el conocimiento de las bases genéticas de la transformación maligna. Gran parte de la investigación inicial acerca de virus RNA tumorales se originó de la idea de que estos agentes pueden ser causas importantes para el desarrollo de cáncer humano. La búsqueda de la causa viral del cáncer condujo al descubrimiento del oncogen, que a su vez llevó a comprobar que el oncogen es una secuencia celular adquirida por el virus, lo que finalmente condujo al descubrimiento de que un oncogen puede causar cáncer sin la participación de un genoma viral. Así, los virus tumorales, que por sí mismos no participan directamente en la mayor parte de los tipos de cáncer humano, han proporcionado la perspectiva necesaria a través de la cual se puede visualizar nuestra propia herencia genética en busca de información que quizá conduzca a nuestra propia destrucción.

BIBLIOGRAFIA

1. Rous, P. 1911. Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. *J. Amer. Med. Assoc.* 56:198.
2. Baltimore, D. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226:1209-1211.
3. Temin, H. y Mizutani, S. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226:1211-1213.
4. Martin, G.S. 1970. Rous sarcoma virus: A function required for the maintenance of the transformed state. *Nature* 227:1021-1023.
5. Stehelin, D. y cols. 1976. Purification of DNA complementary to nucleotide sequences required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses. *J. Mol. Biol.* 101:349-365.
6. Stehelin, D. y cols. 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260:170-173.
7. Spector, D.H., Varmus, H.E. y Bishop, J.M. 1978. Nucleotide sequences related to the transforming gene of avian sarcoma virus are present in DNA of uninfected vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:4102-4106.
8. Purchio, A.F. y cols. 1978. Identification of a polypeptide encoded by the avian sarcoma virus *src* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:1567-1671.
9. Collet, M.S. y Erikson, R.L. 1978. Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus *src* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:2021-2024.
10. Willingham, M.C., Jay, G. y Pastan, I. 1979. Localization of the ASV *src* gene product to the plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunocytochemistry. *Cell* 18:125-134.
11. Hunter, T. y Sefton, B.M. 1980. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:1311-1315.
12. Shih, C. y cols. 1979. Passage of phenotypes of chemically transformed cells via transfection of DNA and chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:5714-5718.
13. Krontiris, T.G. y Cooper, G.M. 1981. Transforming activity of human tumor DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1181-1184.
14. Goldfarb, M. y cols. 1982. Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells. *Nature* 296:404-409.
15. Shih, C. y Weinberg, R.A. 1982. Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell* 29:161-169.
16. Pulciani, S. y cols. 1982. Oncogenes in human tumor cell lines: Molecular cloning of a transforming gene from human bladder carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79:2845-2849.
17. Parada, L.F. y cols. 1982. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus *ras* gene. *Nature* 297:474-478.
18. Der, C.J. y cols. 1982. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the *ras* genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79:3637-3640.
19. Santos, E. y cols. 1982. T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature* 298:343-347.
20. Tabin, C.J. y cols. 1982. Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* 300:143-149.
21. Reddy, E.P. y cols. 1982. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 300:149-152.
22. Taparowsky, E. y cols. 1982. Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature* 300:762-765.

SINOPSIS

El cáncer es una enfermedad que implica defectos hereditarios en los mecanismos de control celular, que dan como resultado la formación de tumores invasivos capaces de liberar células que propagan la enfermedad a sitios distantes del cuerpo. Muchas de las características de las células tumorales se pueden observar en cultivo. En tanto las células normales proliferan en cultivo hasta formar una sola capa (monocapa) en el fondo del plato de cultivo, las células cancerosas continuarán creciendo apilándose una sobre otra para formar grumos. Otras características reveladas con frecuencia en las células cancerosas son su capacidad para crecer cuando están suspendidas en agar suave, tendencia a mostrar un número anormal de cromosomas; capacidad para continuar dividiéndose de manera indefinida; desorganización del citoesqueleto; y falta de respuesta a las células vecinas, particularmente en relación con actividades locomotoras (p. 672).

Las células normales se pueden convertir en células cancerosas mediante tratamiento con una gran variedad de sustancias químicas, radiación ionizante y varios virus que contienen DNA y RNA; todos estos agentes actúan provocando cambios en el genoma de la célula transformada. El análisis de las células de un tumor canceroso casi siempre muestra que las células se originan por el crecimiento de una sola célula (se dice que el tumor es monoclonal). El desarrollo de un tumor maligno es un proceso de múltiples etapas caracterizado por progresión de las alteraciones genéticas que disminuyen cada vez más la respuesta de las células a los mecanismos reguladores normales y les confieren mayor capacidad para invadir tejidos normales. Los genes que participan en la carcinogénesis constituyen un subconjunto específico del genoma cuyos productos participan en actividades como control del ciclo celular, adherencia entre las células y reparación del DNA. Se cree que es el efecto en conjunto de varias mutaciones y no la secuencia particular de las mismas lo que es importante para el desarrollo del estado maligno. Además de alteraciones genéticas, el crecimiento de células tumorales también está bajo la influencia de factores no genéticos o epigenéticos que permiten a la célula expresar su fenotipo maligno. Por ejemplo, los estrógenos parecen promover el desarrollo de tumores mamarios (p. 673).

Los genes implicados en la carcinogénesis se dividen en dos amplias categorías: genes supresores de tumor y oncogenes. Los genes supresores de tumor codifican proteínas que restringen el crecimiento de la célula y evitan la malignización de las mismas. Los genes supresores de tumor actúan con característica recesiva, puesto que se deben borrar ambas copias o sufrir mutación antes que se pierda su función protectora. Los oncogenes, en contraste, codifican proteínas que promueven la pérdida de control del crecimiento y la malignización. Los oncogenes se originan de protooncogenes, genes que codifican proteínas con participación en las actividades normales de la célula. Las mutaciones que alteran la proteína o su expresión provocan que el protooncogen actúe de manera normal y promueva la formación de tumor. Los oncogenes actúan con característica dominante; o sea, sólo se requiere una sola copia

para que la célula exprese el fenotipo alterado. La mayor parte de los tumores contienen alteraciones en ambos genes supresores de tumor y oncogenes. Mientras la célula tenga cuando menos una copia de todos sus genes supresores de tumor, debe estar protegida contra las consecuencias de la formación del oncogene. Por lo contrario, la pérdida de la función de los supresores de tumor no debe ser suficiente, por sí sola, para provocar que la célula se malignice (p. 679).

El primer gen supresor de tumor identificado fue *RB*, causante de un raro tumor de la retina llamado retinoblastoma, que aparece con mayor frecuencia en ciertas familias pero también puede ocurrir esporádicamente. Los niños con la forma familiar de la enfermedad heredan una copia mutada de genes. Estos individuos desarrollan el cáncer sólo después de daño esporádico al segundo alelo en una de las células de la retina. *RB* codifica una proteína llamada pRb, que participa en la regulación del paso de una célula de G₁ a S en el ciclo celular. La forma no fosforilada de pRb interactúa con ciertos factores de transcripción evitando que se unan al DNA y activando los genes requeridos para ciertas actividades de la fase S. Una vez fosforilado pRb, la proteína libera su factor de transcripción enlazado, que entonces puede activar la expresión del gen, conduciendo al inicio de la fase S (p. 681).

El gen supresor del tumor implicado con mayor frecuencia en el cáncer humano es *p53*, cuyo producto (p53) puede evitar la formación de cáncer mediante varios mecanismos diferentes. En una de sus acciones, p53 actúa como factor de transcripción que activa la expresión de una proteína (p21) inhibidora de la cinasa dependiente de ciclina que mueva a la célula a través del ciclo celular. El daño al DNA provoca la síntesis de p53, lo que conduce a la detención del ciclo celular en tanto se repara el daño. p53 también puede reorientar células en camino hacia la malignización y dirigir las por vías alternas que conducen a una muerte programada, o apoptosis. El *p53* de ratones knockout inicia el desarrollo de tumores varias semanas después del nacimiento. Otros genes supresores de tumor incluyen a *PAC*, que cuando sufre mutación predispone a la persona al desarrollo de cáncer de colon, y *BRCA1* y *2*, que cuando sufren mutación predisponen a las mujeres a desarrollar cáncer mamario (p. 684).

La mayor parte de los oncogenes conocidos se derivan de protooncogenes que participan en las vías que transmiten señales de crecimiento desde el ambiente extracelular al interior de la célula, particularmente al núcleo celular. A diferencia de los genes supresores de tumor, los oncogenes no se han implicado en las formas hereditarias de cáncer. Se han identificado algunos oncogenes que codifican factores de crecimiento o sus receptores, incluyendo *sis*, el gen que codifica al factor de crecimiento derivado de plaquetas (FCDP), y *erbB*, el gen que codifica al receptor del factor de crecimiento epidérmico (FCE). A veces las células malignas contienen un número mucho mayor de uno de estos receptores de factores de crecimiento en sus membranas plasmáticas en comparación con células normales. El exceso de receptores hace sensibles a las

células a concentraciones más bajas del factor de crecimiento, y por lo tanto, las estimula para dividirse en condiciones que no afectarían a células normales. Algunas proteincinasas citoplásmicas, incluyendo cinasas de serina-treonina y de tirosina, se encuentran en la lista de oncogenes. Estas incluyen *raf*, que codifica una proteincinasa en la cascada cPAM. Las mutaciones en *ras* se encuentran entre los oncogenes más comunes observados en el cáncer humano. Como se analiza en el capítulo 15, Ras activa la función de proteincinasa de Raf. Si Raf permanece en estado activado, continúa enviando señales a lo largo de la vía cPAM, que conducen a la estimulación continua de la proliferación celular. Algunos oncogenes, como *mic*, codifican proteínas que actúan como factores de transcripción. Mic normalmente es una de las primeras proteínas que aparecen cuando se estimula una célula para reingresar al ciclo celular a partir de la fase en reposo G₀. La sobreexpresión de *mic* puede provocar que las células continúen proliferando porque superan las influencias inhibitoras ejercidas por los productos de los genes supresores de tumor. Otro grupo de oncogenes, como el *bcl-2*, al parecer codifica proteínas que participan en la apoptosis. Las pruebas sugieren que la sobreexpresión del gen

bcl-2 conduce a la supresión de la apoptosis de tejidos linfoides, permitiendo proliferar a células anormales para formar tumores linfoides (p. 688).

Los genes que codifican proteínas que participan en la reparación del DNA también se han implicado en la carcinogénesis. El genoma de pacientes con la forma hereditaria más común de cáncer de colon, llamado cáncer hereditario no poliposo de colon (CHNPC), contiene secuencias microsatélites de varios nucleótidos anormales. Los cambios de longitud de una secuencia microsatélite son productos de errores durante la duplicación, que normalmente son reconocidos por enzimas encargadas de reparar los pares de bases impropios. Esto sugiere que el defecto en este sistema puede ser causa de cáncer. Esta conclusión se apoya en el dato de que extractos de células de tumores CHNPC muestran deficiencia en la reparación del DNA. Sería de esperar que las células con estas deficiencias muestren un nivel mucho mayor de mutaciones en los genes supresores de tumor y en los oncogenes que provocarían un riesgo mucho mayor de malignización (p. 690).

BIBLIOGRAFIA

- Amato, I. 1993. Hope for a magic bullet that moves at the speed of light. *Science* 262:32-33.
- Beardsley, T. 1994. A war not won. *Sci. Am.* 270:130-138 (ene.).
- Bishop, J.M. 1991. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 74:235-248.
- Brugge, J. y cols., eds. 1991. *Origins of Human Cancer*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cavenee, W.K. y White, R.L. 1995. The genetic basis of cancer. *Sci. Am.* 272:72-79 (marzo).
- Cohen, J. 1993. Cancer vaccines get a shot in the arm. *Science* 262:842-843.
- Cuthill, S. 1994. Cellular epigenetics and the origin of cancer. *Bioess.* 16:393-394.
- Evans, C.W. 1991. *The Metastatic Cell: Behaviour and Biochemistry*. Chapman & Hall.
- Fisher, D.E. 1994. Apoptosis in cancer therapy: Crossing the threshold. *Cell* 78:1051-1054.
- Franks, L.M. y Teich, N.M. eds. 1991. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. 2a. ed. Oxford University Press.
- Friend, S. 1994. p53: A glimpse at the puppet behind the shadow play. *Science* 266:334-335.
- Hinds, P.W. y Weinberg, R.A. 1994. Tumor-suppressor genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4:135-141.
- Harrington, E.A. y cols. 1994. Oncogenes and cell death. *Curr. Opin. Genes Develop.* 4:120-129.
- Harris, C.C. 1993. p53: At the crossroads of molecular carcinogens and risk assessment.
- Lane, D.P. 1992. p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15.
- Lane, D.P. 1993. A death in the life of p53. *Nature* 362:786-787.
- Lowy, D.R. y Willumsen, B.M. 1995. Rational cancer therapy. *Nature Medicine* 1:747-748.
- Marshall, E. 1993. Search for a killer: Focus shifts from fats to hormones. *Science* 259:618-621.
- Marx, J. 1993. Cell death studies yield cancer clues. *Science* 259:760-761.
- Marx, J. 1994. New look found between p53 and DNA repair. *Science* 266:1321-1322.
- Marx, J. 1994. How cells cycle toward cancer. *Science* 263:319-321.
- Marx, J. 1994. New tumor suppressor may rival p53. *Science* 264:344-345.
- Nevins, J.R. 1994. Cell cycle targets of the DNA tumor viruses. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4:130-134.
- Nowak, R. 1994. Breast cancer offers surprises. *Science* 265:1796-1798.
- Nowak, R. 1994. A new gives early warning of a growing killer. *Science* 264:1847-1848.
- Nowak, R. 1995. Discovery of AT gene sparks biomedical research bonanza. *Science* 268:1700-1701.
- Parkham, P. 1994. Politically incorrect viruses. *Nature* 368:495-496.
- Pawson, T. y Hunter, T. eds. 1994. Oncogenes and cell proliferation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4:1-141.
- Picksley, S.M. y Lane, D.P. 1994. p53 and Rb: Their cellular roles. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:853-858.
- Pietenpol, J.A. y Vogelstein, B. 1993. No room at the p53 inn. *Nature* 365:17-18.
- Rabbits, T.H. 1994. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372:143-149.
- Radman, M. y Wagner, R. 1993. Missing mismatch repair. *Nature* 366:722.
- Raff, M.C. 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356:397-400.
- Rodrigues, G.A. y Park, M. 1994. Oncogenic activation of tyrosine kinases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4:15-24.
- Rosenberg, S.A. y Barry, J.M. 1992. *The Transformed Cell*. Putman.
- Rustgi, A.K. y cols. 1992. The molecular basis of colon cancer. *Ann. Rev. Med.* 43:61-68.

- Service, R.E. 1994. Stalking the start of colon cancer. *Science* 263:1559-1560.
- Stetler, W.G. y cols. 1993. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Ann. Rev. Cell Biol.* 9:541-573.
- Stillman, B. y cols. 1994. The molecular genetics of cancer. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* vol. 49.
- Travis, J. 1992. Closing in on melanoma susceptibility genes. *Science* 258:1080-1081.
- Varmus, H.E. y Levine, A.J. 1983. *Readings in Tumor Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Varmus, H. y Weinberg, S.A. 1992. *Genes and the Biology of Cancer*. Scientific American Library.
- Vogelstein, B. y Kingler, K.W. 1994. X-rays strike p53 again. *Nature* 370:174-175.
- White, E. 1994. p53, guardian of Rb. *Nature* 371:1-2.
- Yokota, J. y Sugimura, T. 1993. Multiple steps in carcinogenesis involving alterations of multiple tumor suppressor genes. *FASEB J.* 7:920-925.

Técnicas en biología celular y molecular

17-1 El microscopio de luz

17-2 Microscopio de transmisión electrónica

17-3 Microscopio electrónico tridimensional

17-4 Uso de radioisótopos

17-5 Cultivo de células

17-6 Fraccionamiento del contenido de una célula por centrifugación diferencial

17-7 Aislamiento, purificación y fraccionamiento de proteínas

17-8 Determinación de la estructura de una proteína mediante análisis de difracción de rayos X

17-9 Purificación y fraccionamiento de ácidos nucleicos

17-10 Cuantificación de las concentraciones de proteínas y ácidos nucleicos mediante espectrofotometría

17-11 Ultracentrifugación

17-12 Tecnología del DNA recombinante

17-13 Uso de anticuerpos

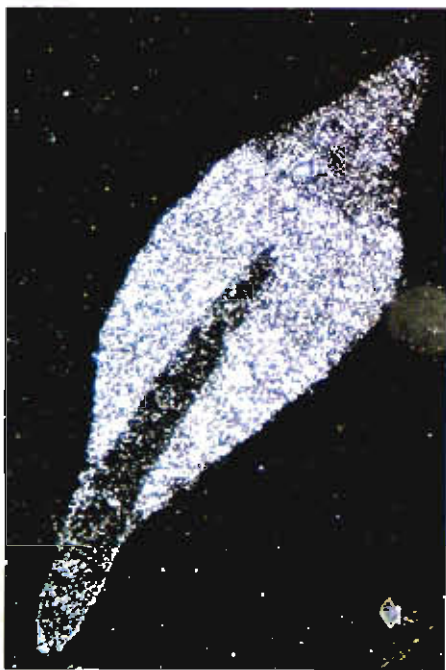


FIGURA 17-A. Autorradiografía de un corte a través de un agregado de moho de fango durante la formación de un cuerpo frutal, mostrando los sitios de incorporación del azúcar marcado con radiactividad. Los granos plateados aparecen en color blanco debido a que la muestra se ve bajo iluminación en campo oscuro. Con este tipo de iluminación, la luz del condensador incide sobre la muestra pero no penetra a la lente objetivo. Como resultado, el fondo es oscuro en tanto que la muestra es brillante (fotografía del autor).

Dadas las dimensiones verdaderamente pequeñas de los objetos materiales que estudia, la biología celular y molecular depende mucho más del desarrollo de nuevos instrumentos y técnicas en comparación con cualquiera otra rama de la biología. Por consiguiente, es difícil estudiar biología celular y molecular sin aprender también algo acerca de la tecnología necesaria para recopilar los datos. Estudiaremos los métodos utilizados con mayor frecuencia en este campo sin profundizar en todos los detalles y las variaciones que se emplean. Estos son los objetivos del presente capítulo: describir de qué manera se usan las diferentes técnicas y proporcionar ejemplos del tipo de información que se puede obtener utilizando dichas técnicas. Iniciaremos con el instrumento que permitió a los biólogos descubrir la existencia física de las células, que es el punto de partida de toda la información presentada en este texto.

17-1 El microscopio de luz

El diagrama del microscopio de luz mostrado en la figura 17-1 indica sus elementos más importantes. Una fuente de luz que puede ser externa al microscopio o integrada en su base, necesaria para iluminar la muestra. Se requiere un condensador debajo de la platina para concentrar los rayos

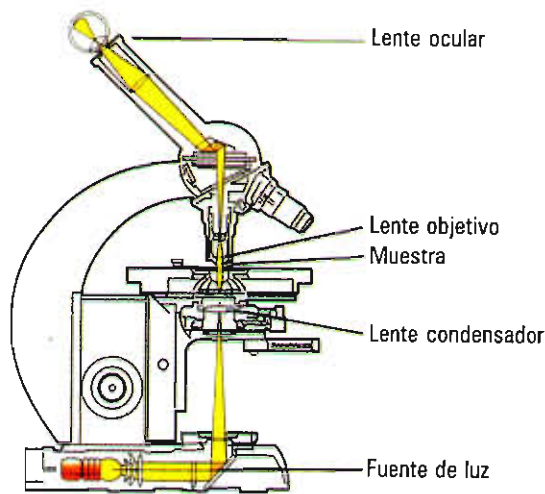


FIGURA 17-1. Diagrama de un corte de un microscopio compuesto.

de luz dispersos procedentes de la fuente e iluminar la muestra con un pequeño cono de luz con intensidad suficiente para permitir observar las partes muy pequeñas de la muestra luego de la amplificación. La manera de iluminar la muestra puede ser de importancia extrema para definir la calidad de la imagen obtenida. Los rayos de luz enfocados

sobre la muestra por el condensador también son recolectados por la **lente objetivo** del microscopio.

Desde este punto de vista, es necesario considerar dos grupos de rayos de luz que penetran a la lente objetivo: los modificados por la muestra y los que no lo son (fig. 17-2). El último grupo forma un cono de luz procedente de la lente del condensador que atraviesa directamente hacia la lente objetivo y constituye la luz de fondo sobre el campo visual. El primer grupo de rayos de luz son los que surgen, en cierto sentido, de los diferentes puntos que constituyen la muestra. Los rayos de luz procedentes de la muestra son conducidos al foco por la lente objetivo para formar una imagen real ampliada del objeto dentro de la columna del microscopio (fig. 17-1). La imagen formada por la lente objetivo se emplea entonces como objeto por un segundo sistema de lentes, la **lente ocular**, que utiliza como objeto la imagen formada por la lente objetivo para formar una imagen virtual ampliada. Un tercer sistema de lentes, localizado enfrente del ojo, usa como objeto la imagen virtual producida por la lente ocular para generar una imagen real sobre la retina. Cuando se gira el botón para enfocar el microscopio de luz, la distancia relativa entre la muestra y la lente objetivo cambia permitiendo que la imagen final se enfoque sobre el plano de la retina. La amplificación total alcanzada por el microscopio es producto de la amplificación producida por la lente objetivo y la producida por la lente ocular.

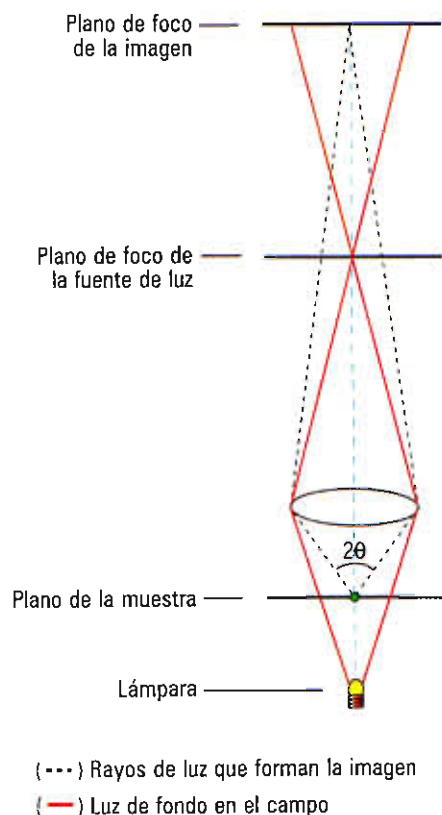


FIGURA 17-2. Trayectoria de los rayos de luz que forman la imagen y la de aquellos que constituyen la luz de fondo en el campo.

Resolución

Hasta aquí sólo hemos considerado la amplificación de un objeto empleando las propiedades de refracción de las lentes sin prestar atención alguna a la calidad de la imagen producida, o sea, en qué grado la imagen retiene los detalles de la muestra. Asumiremos que se está mirando una estructura en el microscopio utilizando una lente objetivo de potencia relativamente alta (por ejemplo $63\times$) y una lente ocular que amplifique la imagen de la lente objetivo otras cinco veces (un ocular $5\times$). Supongamos que el campo se compone de cromosomas y es importante determinar el número de éstos, pero algunos de ellos están muy próximos y no se pueden distinguir como estructuras separadas (fig. 17-3, a). Una solución aparente del problema podría ser cambiar el ocular para incrementar el tamaño del objeto que se observa. Si se cambiara de un ocular $5\times$ a un $10\times$, probablemente se podría incrementar la capacidad para determinar el número de cromosomas presentes (fig. 17-3, b) porque ahora la imagen de los cromosomas producida por la lente objetivo se ha extendido sobre una mayor superficie de la retina. Cuanto más fotorreceptores se incluyan para suministrar información relacionada con la imagen, se observarán más detalles (fig. 17-4). Sin embargo, si se cambia a un ocular $20\times$, tal vez no se vean detalles adicionales, aunque la imagen sea de mayor tamaño que la previamente observada (fig. 17-3, c), o sea, ocupará una mayor superficie de la retina. La razón de la falta de discriminación adicional luego de este segundo cambio es que la imagen producida por la lente objetivo no posee detalles adicionales amplificables con el mayor poder de la lente

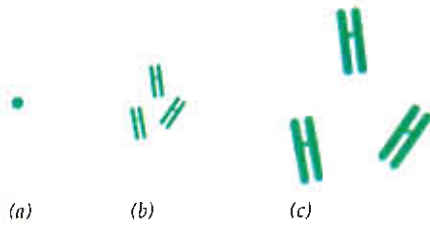


FIGURA 17-3. Amplificación comparada con resolución. La transición desde *a* a *b* suministra al observador una mayor amplificación y resolución, en tanto que la transición de *b* a *c* sólo proporciona mayor amplificación (amplificación vacía).

ocular. El incremento de la imagen más allá del punto donde la retina suministra mayor información simplemente es *amplificación vacía* (como en la figura 17-3, *c*).

La calidad óptica de una lente objetivo determinada se mide por el grado con que se pueden discriminar o resolver los detalles finos presentes en una muestra. **Resolución** se define más simplemente como la capacidad para ver dos puntos vecinos en el campo visual como entidades diferentes. Si las dos partes distintas de un objeto no están separadas por una distancia suficiente (como en la figura 17-4), se verán como una sola estructura; o sea, no serán resueltas. Los factores que determinan cuál puede ser una distancia suficiente son muchos; algunos factores limitantes son inherentes a todo sistema de lentes, en tanto que otros se corrigen con microscopios de mejor calidad.

La resolución alcanzable por un microscopio está limitada por la longitud de onda de la luz según la ecuación

que a continuación se muestra:

$$D = \frac{0.61 \lambda}{n \sin \theta}$$

donde *D* es la distancia mínima que debe separar a dos puntos de la muestra para ser resueltos, λ es la longitud de onda de la luz (527 nm para luz blanca) y *n* es el índice de refracción del medio. Theta (θ) es el ángulo mostrado en la figura 17-2, que mide la capacidad de la lente para concentrar la luz y se relaciona directamente con su abertura.

El denominador de tal ecuación se denomina *abertura numérica* (A.N.). La abertura numérica es una constante de cada lente y mide su calidad para concentrar luz. Para una lente objetivo diseñada para usar en el aire, la A.N. máxima posible es de 1.0, puesto que el seno del ángulo teta máximo posible, 90°, es 1 y el índice de refracción del aire es 1.0. Para un objetivo diseñado para sumergir en aceite, la máxima A.N. es de aproximadamente 1.5. Una regla nemotécnica común es que la amplificación útil para un microscopio es de aproximadamente 1 000 veces la abertura numérica de la lente objetivo que se emplea. Cuando se intenta aumentar la imagen más allá de este punto se obtiene una amplificación vacía con deterioro de la calidad de imagen. Utilizando lentes de distancia focal corta, que pueden colocarse muy cerca de la muestra, se logra una abertura numérica elevada.

Si en la ecuación precedente se sustituyen longitud de onda mínima y mayor abertura numérica posible se puede determinar el **límite de resolución** del microscopio de luz. Efectuando estas sustituciones se obtiene un valor ligeramente menor de 0.2 μm (o 200 nm), suficiente para resolver los organelos celulares más grandes, como el núcleo y las mitocondrias. En contraste, el límite de resolución del ojo desnudo, cuya abertura numérica es de casi 0.004, es de aproximadamente 0.1 mm (0.0036 pulgadas).

Además de estos factores teóricos, la resolución de las lentes puede estar notablemente afectada por ciertas aberraciones. Hay siete tipos principales de aberraciones que indican los inconvenientes que deben superarse para producir lentes objetivos cuyo verdadero poder de resolución se aproxime a su límite teórico. La razón de construir lentes objetivos con una serie complicada de lentes en vez de una sola lente de tipo convergente es eliminar estas aberraciones. Típicamente, una sola lente logra la amplificación, en tanto que las otras compensan los errores de la primera lente para suministrar una imagen total correcta.

Visibilidad

El aspecto más práctico del microscopio respecto del límite de resolución es el tema de la *visibilidad* relacionada con los factores que permiten observar en realidad un objeto. Esto puede parecer un asunto trivial; si hay un objeto debe poder observarse. Consideremos el caso de una cuenta de vidrio. En la mayor parte de las situaciones, o sea, cualesquiera que sean las condiciones de la luz de fondo, la cuenta es claramente visible. Toda persona que ha pasado algún tiempo observando una ameba puede apreciar el problema de la visibilidad cuando emplea el microscopio de luz.

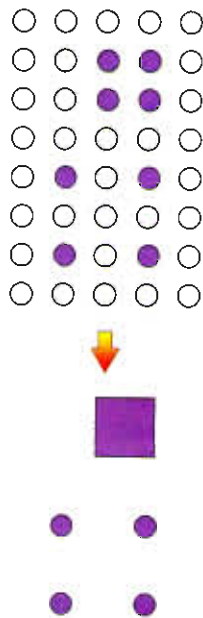


FIGURA 17-4. Poder de resolución del ojo. Ilustración muy esquematizada de la relación entre la estimulación de fotorreceptores individuales (arriba) y la escena resultante que percibe el ojo (abajo). El diagrama ilustra la importancia de que la imagen caiga en un área de tamaño suficiente en la retina.

Lo que vemos a través de una ventana, o del microscopio, son los objetos que la luz afecta de manera diferente a la iluminación del fondo. Otro término para visibilidad en este sentido de la palabra es **contraste**, o diferencia entre partes adyacentes de un objeto o de un objeto contra el fondo iluminado. Para lograr visibilidad en el mundo macroscópico, examinamos los objetos cuando la luz incide sobre ellos (luz incidente) y luego observamos la luz reflejada por el objeto hacia nuestros ojos. En microscopia, colocamos el objeto entre la fuente de luz y nuestros ojos, y observamos la luz transmitida a través del objeto. Si llevamos un objeto al interior de una habitación donde hay una fuente de luz y lo sostenemos entre la fuente de luz y el ojo quizá podamos apreciar parte de la dificultad con ese tipo de iluminación; aunque para ello es necesario que el objeto examinado sea casi transparente, o sea, translúcido. En esto estriba otro aspecto del problema: los objetos "casi transparentes" pueden ser difíciles de ver.

Una de las mejores maneras de elaborar muestras delgadas, translúcidas, visibles con el microscopio es teñirlas con algún colorante que sólo absorba ciertas longitudes de onda del espectro visible. Las longitudes de onda que no se absorben se transmiten al ojo y como resultado el objeto teñido aparece de un color. Los diferentes colorantes se enlazan a diferentes tipos de moléculas biológicas y, por lo tanto, estos procedimientos no sólo incrementan la visibilidad de la muestra, sino también pueden indicar dónde se encuentran las sustancias en las células o en los diferentes tipos de tejidos. Un buen ejemplo es la tinción de Feulgen, específica para DNA, gracias a la cual el DNA aparece de color bajo el microscopio (fig. 17-5). El núcleo de la célula es almacén de DNA, y cuando se emplea la tinción de Feulgen se vuelve visible. Uno de los principales problemas con las tinciones es que en general no pueden usarse en células vivientes; de ordinario son tóxicas, o las condiciones de tinción son mortales, o no penetra a través de la membrana plasmática. Por ejemplo, la tinción de Feulgen requiere hidrólisis ácida del tejido antes de aplicarse. Unas pocas tinciones, llamadas *tinciones vitales*, son adecuadas para usar en células vivientes (por ejemplo las mitocondrias observadas en la figura 5-21), pero su uso es limitado.

Cuando un condensador situado debajo del portaobjetos obliga a la luz procedente de la fuente a convergir sobre la muestra formando un cono de luz brillante que puede entrar a la lente objetivo, el microscopio se denomina de **campo brillante**. La luz que ilumina el campo se observa como un cono brillante contra el cual se puede contrastar la imagen de la muestra. El microscopio de campo brillante es ideal para muestras con alto contraste, como cortes de tejido teñidos, pero quizá no proporcione visibilidad óptima para otras muestras. En las siguientes secciones consideraremos varios métodos alternativos de aumentar la visibilidad de la muestra con el microscopio de luz.

Microscopio de contraste de fases

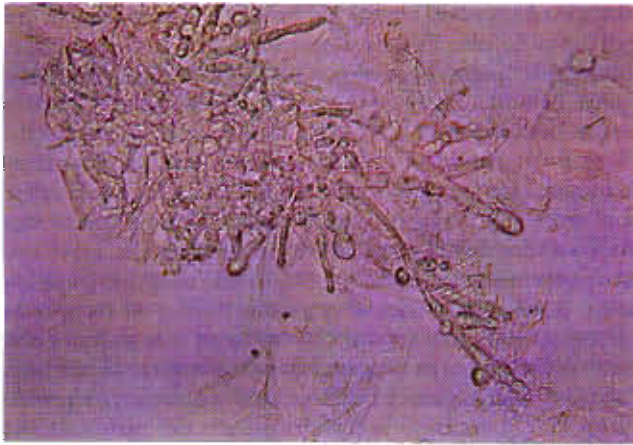
Muestras pequeñas sin teñir, como la célula viviente, pueden ser muy difíciles de observar en un microscopio de campo brillante (fig. 17-6, a). El **microscopio de contraste**



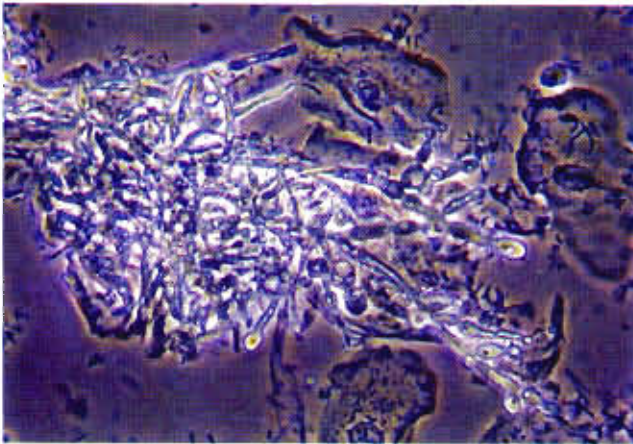
FIGURA 17-5. Tinción de Feulgen. Este procedimiento de tinción es sumamente específico para DNA, según lo indica la localización del colorante en los cromosomas en las células del extremo de las raíces de la cebolla que se encontraba en la metafase de mitosis en el momento de ser fijada. (Por Ed Reschke/Peter Arnold, Inc.)

de fases supera esta dificultad haciendo más visibles objetos muy transparentes (fig. 17-6, b). La posibilidad de observar las diferentes partes de un objeto depende de la capacidad de dichas partes para afectar la luz de manera diferente. Una característica básica en la cual difieren los organelos intracelulares es su índice de refracción. Los organelos celulares están formados de varias moléculas de diferentes proporciones: DNA, RNA, proteínas, lípidos, carbohidratos, sales y agua. Las regiones de composición diferente tal vez tengan índices de refracción diferentes. Sin embargo, en condiciones normales nuestros ojos no pueden determinar estas diferencias. El microscopio de contraste de fases convierte las diferencias del índice de refracción en diferencias de intensidad (brillo y oscuridad relativas), que entonces se hacen visibles al ojo. Esta conversión depende de la capacidad de las ondas de luz para interactuar entre sí, propiedad denominada **interferencia**.

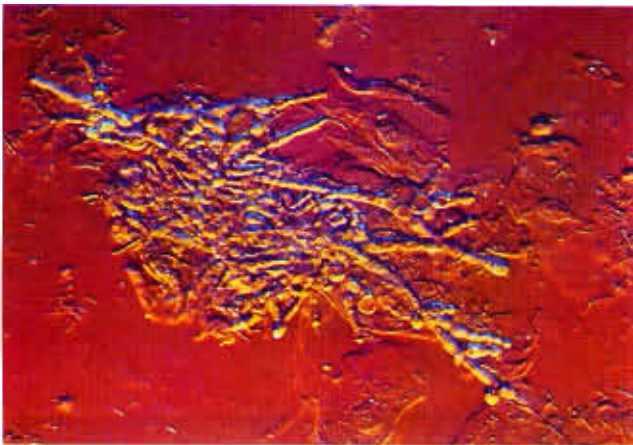
Gracias a su estructura, el microscopio de contraste de fases ejecuta dos funciones que el microscopio de campo brillante no puede realizar: separa la luz directa (luz de fondo en el campo) de la luz difractada por el objeto, y desfasa estos dos tipos de ondas luminosas más o menos una mitad de la longitud de onda, de modo que al interactuar pueden cancelarse y provocar cambios de intensidad. Por un momento podemos asumir que todas las partes del objeto examinado tienen exactamente igual índice de refracción que el medio donde están suspendidas. Si éste fuera el caso, toda la luz del objeto y la luz directa estarían desfasadas una mitad de la longitud de onda, y al interferir la intensidad disminuiría de manera uniforme (como en la figura 17-7). Consideremos ahora un objeto cuyas diferentes par-



(a)



(b)



(c)

FIGURA 17-6. Comparación de las células observadas con diferentes tipos de microscopio de luz. Micrografía de luz de células de levadura (*Candida albicans*) en desarrollo sobre el epitelio vaginal observadas en campo brillante (a), contraste de fases (b) y contraste por interferencia diferencial (CID) (o de Nomarski). Nótese que las células del epitelio vaginal de la derecha son prácticamente invisibles con iluminación en campo brillante, pero claramente observadas bajo microscopía de contraste de fases y contraste por interferencia diferencial. (Micrografía por M.I. Walker/Photo Researchers, Inc.)

tes muestran diversos índices de refracción, todos mayores que el correspondiente al medio que los rodea. Los diferentes índices de refracción generan cambios de fase de los rayos de luz que pasan a través de las distintas partes de la muestra (fig. 17-8). El brillo u oscuridad relativa de cada parte de la imagen refleja la interferencia de la luz procedente de esa parte con la luz directa. Puesto que las partes de la muestra tienen diversos índices de refracción, las diferentes partes de dicha muestra aparecen en la imagen con intensidad variable y por lo tanto suministran el contraste necesario para visualizarlas.

El contraste óptico de fases es muy útil para examinar componentes intracelulares de células vivas con resolución relativamente elevada. Por ejemplo, se puede observar y filmar la dinámica de la motilidad de las mitocondrias, cromosomas mitóticos y vacuolas. La simple observación de minúsculas partículas y vacuolas chocando dentro de la célula totalmente al azar induce un sentimiento acerca de los seres vivientes, inalcanzable por la observación de células muertas teñidas. La observación de células vivientes sobre una pantalla de televisión mediante una cámara de video proporciona imágenes especialmente espectaculares de las actividades dinámicas de una célula. El mayor beneficio obtenido de la invención del microscopio de contraste de fases no es el descubrimiento de nuevas estructuras, sino su uso cotidiano en laboratorios de investigación y enseñanza para mirar células de manera mucho más reveladora.

El microscopio de contraste de fases sólo es apropiado para observar células aisladas o en capas delgadas. Además, tiene el inconveniente óptico de disminuir la resolución y producir sombras y halos de interferencia que generan bordes donde el índice de refracción cambia bruscamente. El microscopio de contraste de fases es un *microscopio de interferencia*. Se han construido otros tipos de *microscopios de interferencia* que reducen al mínimo los artefactos ópticos y separan por completo los rayos de luz directa y de luz difractada mediante el uso de prismas y transmisión de la luz a través de vías complicadas. Un tipo de interferencia óptica, llamada **contraste por interferencia diferencial (CID)** o a veces interferencia de Nomarski por su descubridor, suministra una imagen de calidad aparentemente tridimensional (fig. 17-6, c). En la microscopía CID, el contraste depende de la tasa de cambio del índice de refracción a través de una muestra. Como consecuencia, los bordes de las estructuras, donde el índice de refracción varía notablemente en una distancia relativamente pequeña, se observan con contraste especialmente satisfactorio.

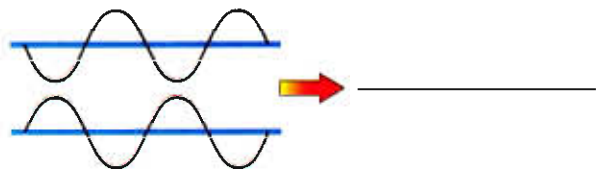


FIGURA 17-7. Interferencia destructiva. Las dos ondas de luz están desfasadas una mitad de la longitud de onda. Cuando las ondas se encuentran, se combinan para cancelarse.

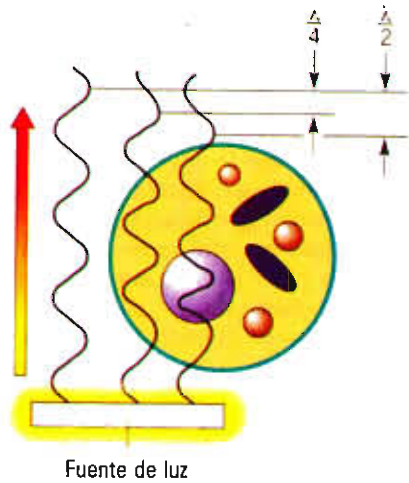


FIGURA 17-8. Diagrama de los diferentes grados de retraso de los rayos de luz conforme pasan a través de diversas partes de una célula. Los rayos de luz que surgen de las distintas partes de una célula se encuentran en diferentes fases de su ciclo, por lo que interfieren con los rayos de luz directa en diferente grado, produciendo distintos grados de brillo y de oscuridad en la imagen final.

Microscopia de fluorescencia

Ciertas moléculas (llamadas *fluorocromos*) absorben radiación invisible, longitud de onda ultravioleta, y liberan parte de la energía en forma de longitud de onda más larga, luz visible, provocando destellos contra un fondo oscuro. Gracias a esta propiedad se puede descubrir la distribución de estas moléculas dentro de un tejido mediante examen con microscopio de luz. En algunos estudios, el compuesto fluorescente se inyecta a una célula viviente y se sigue su destino dentro de la célula en tanto continúa sus actividades normales. Por ejemplo, se pueden usar fluorocromos para estudiar el tamaño de las moléculas capaces de pasar entre las células (fig. 7-32) como indicadores de potenciales a través de la membrana (fig. 5-21), o como sondas para determinar la concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma (fig. 15-15). Alternativamente, se pueden unir fluorocromos mediante enlaces covalentes (*conjugados*) a una proteína particular como actina o tubulina y la proteína así marcada con fluorescencia se puede inyectar dentro de una célula viviente. Las proteínas marcadas participan en las actividades normales de la célula y se les puede seguir por medio del microscopio para conocer las actividades dinámicas en las cuales participan (figs. 9-3 y 9-75). De manera similar, cuando se inyectan anticuerpos fluorescentes a una célula o se añaden a un corte de tejido, se puede determinar la posición del antígeno correspondiente (figs. 9-5 y 12-20). También se pueden usar fluorocromos en estudios de hibridación de DNA-RNA, según se describe en la página 406 y se ilustra en la figura 10-21.

Microscopio de polarización

El microscopio de polarización tiene una función especial que permite obtener información acerca de la organización

biológica a un nivel menor del límite de resolución del microscopio de luz. Esto se logra gracias a que estructuras submicroscópicas bien alineadas poseen una propiedad óptica llamada *birrefringencia*. Un objeto posee birrefringencia cuando emite brillo (fig. 17-9) si se coloca entre dos filtros polarizantes orientados con sus respectivos planos de transmisión perpendiculares entre sí. La luz que atraviesa el primer filtro se convierte en un plano polarizado; o sea, las ondas de luz vibran en una sola dirección. En ausencia de una muestra birrefringente, los rayos de luz polarizada no pueden atravesar el segundo filtro y el campo del microscopio aparece oscuro. Sin embargo, si la muestra contiene elementos cuya orientación permite girar la luz polarizada, el objeto aparece brillante contra el fondo oscuro. La figura 17-9, a, muestra la birrefringencia del huso mitótico provocada por la alineación de los microtúbulos que en gran número entran en su composición. Otras estructuras celulares birrefringentes incluyen filamentos de miosina en el músculo estriado (fig. 17-9, b), cloroplastos (debido al apilamiento de sus membranas internas), paredes de células vegetales y diferentes tipos de inclusiones cristalinas.



FIGURA 17-9. Visualización de las estructuras subcelulares compuestas de elementos alineados en el microscopio de polarización. a) El huso metafásico de un oocito muestra una notable birrefringencia en un gran número de microtúbulos orientados. b) Las bandas A de las sarcómeros de una sola miofibrilla aislada de un músculo esquelético aparecen birrefringentes debido a los filamentos de actina y miosina alineados. (a: Según Shinya Inoué y Hidemitsu Sato, *J. Gen. Physiol.* 50:262, 1967; b: según Richard H. Colby, *J. Cell Biol.* 51:765, 1971; con permiso de Rockefeller University Press.)

Videomicroscopia y procesamiento de imagen

El campo microscópico se puede observar con la vista o fotografiar con una cámara, pero también se puede filmar con videocámara. Las videocámaras ofrecen algunas ventajas para visualizar las muestras. Por ejemplo, se pueden construir cámaras muy sensibles a la luz que permiten filmar un campo microscópico con iluminación muy baja. Esto es particularmente útil cuando se observan muestras vivas, fáciles de dañar por el calor de una fuente de luz, y muestras teñidas con colorantes fluorescentes que se desvanecen con rapidez al exponerse a la luz. Además, las videocámaras incrementan mucho el contraste de una imagen de modo que se pueden visualizar objetos muy pequeños. En la fotografía mostrada en la página 381 por ejemplo, se presenta la imagen de un microtúbulo individual (diámetro $0.025\ \mu\text{m}$) que normalmente se encuentra muy por debajo del límite de resolución del microscopio de luz (analizado en *La vía experimental* del capítulo 9). Además, las imágenes captadas mediante videocámara se pueden someter a diferentes tipos de procesamiento por computadora, lo que incrementa mucho la información obtenida. Por ejemplo, en una computadora se pueden almacenar los distractores del fondo del campo visual y después restarlos de la imagen que contiene la muestra. Este tipo de procesamiento de imagen aumenta notablemente la claridad del objeto. De manera similar, las diferencias en el brillo de una imagen pueden convertirse en diferencias de color y hacer el objeto mucho más aparente al ojo, y también permiten someter el objeto a diferentes tipos de análisis matemático.

Microscopio tridimensional confocal

Una de las maneras más informativas (y tediosas) de obtener mayor información acerca de la estructura interna de un objeto de interés biológico, como la disposición espacial de los diferentes tipos de células que constituyen un órgano, es seccionar un bloque del tejido mediante una serie de cortes sucesivos conocidos como **cortes seriados**. Cada uno de los cortes seriados puede entonces examinarse por separado y reconstruir la organización tridimensional de todo el objeto, de memoria o con ayuda de fotografías. Con el desarrollo de imágenes electrónicas y procesamiento de las mismas es posible examinar "cortes" de un objeto sin necesidad de seccionarlo con cuchilla. Cortes fotográficos del cerebro humano efectuados por rastreo con TAC suministran un ejemplo bien conocido de esta técnica.

Normalmente, cuando se examina con el microscopio de luz una célula íntegra o un corte grueso de un órgano, el observador puede ver la muestra a diferente profundidad cambiando la posición de la lente objetivo al girar el botón para enfocar la imagen. Mediante esta maniobra, las diferentes partes de la muestra caen dentro y fuera de foco. El hecho de que la muestra se pueda enfocar a diferentes niveles disminuye la capacidad para formar una imagen nítida porque las partes de la muestra situadas arriba y debajo del plano de foco interfieren con los rayos de luz procedentes de las partes situadas en dicho plano focal. En el último decenio se desarrolló un nuevo tipo de microscopio de luz

denominado **microscopio tridimensional confocal**, con el cual se puede resolver este problema. En este tipo de microscopio la muestra se ilumina con un delgado rayo láser concentrado en un foco que recorre rápidamente la muestra a una profundidad constante iluminando así sólo un delgado plano ("corte óptico") dentro del objeto. Típicamente, este microscopio se emplea para muestras teñidas con colorantes fluorescentes y la luz emitida en el corte óptico iluminado se emplea para formar una imagen de dicho corte sobre una pantalla de video. La figura 17-10 muestra imágenes del núcleo de una célula aislada tomadas en tres planos diferentes. En esta serie de fotografías es evidente que los objetos que quedan fuera del plano de foco tienen poco efecto sobre la calidad de la imagen de cada corte. Es posible almacenar en una computadora imágenes de cortes ópticos separados tomadas a diferentes profundidades y emplearlas para reconstituir una imagen tridimensional computarizada del objeto íntegro.

Preparación de muestras para microscopio de luz

Las muestras observables con el microscopio de luz caen dentro de dos categorías muy amplias: montaje completo y cortes. Un **montaje completo** es un objeto intacto, vivo o muerto, y puede ser un organismo microscópico entero, como un protozoo o una pequeña parte de un organismo de mayor tamaño. Si el objeto es lo bastante transparente se puede observar mediante luz transmitida. Los objetos opacos casi siempre se pueden hacer translúcidos sustituyendo el agua de la muestra con alcohol y sumergiendo el objeto en solventes como tolueno o xileno, en los cuales la muestra aparece transparente.

La mayor parte de los tejidos vegetales y animales son demasiado opacos para analizar al microscopio, excepto cuando se examinan rebanadas muy delgadas, o **cortes**. El primer paso de este proceso es matar las células sumergiendo el tejido en una solución química llamada **fijador**. Un buen fijador penetra con rapidez a través de la membrana celular e inmoviliza todo el material macromolecular, de modo que la estructura de las células se conserva lo más cercana posible a la del estado viviente. Esto tiene importancia obvia cuando se examina la estructura celular al final de un procedimiento para tener la certeza de que lo observado refleja la verdadera estructura de la célula viviente y no es un artefacto producido a través del proceso de fijación. Los fijadores más comunes para microscopio de luz son soluciones de formaldehído, alcohol o ácido acético.

Luego de la fijación, el tejido se deshidrata pasándolo a través de una serie de alcoholes e integrándolo a parafina, que suministra el apoyo mecánico para efectuar los cortes. Una de las grandes ventajas de la parafina como medio de soporte es la facilidad para disolverla y separarla de los cortes mediante diferentes solventes orgánicos. Para quitar la parafina basta con sumergir en tolueno las laminillas que contienen estos cortes, dejando el tejido unido a la laminilla donde se puede teñir o tratar con enzimas, anticuerpos u otros agentes. Luego del procedimiento de tinción se coloca

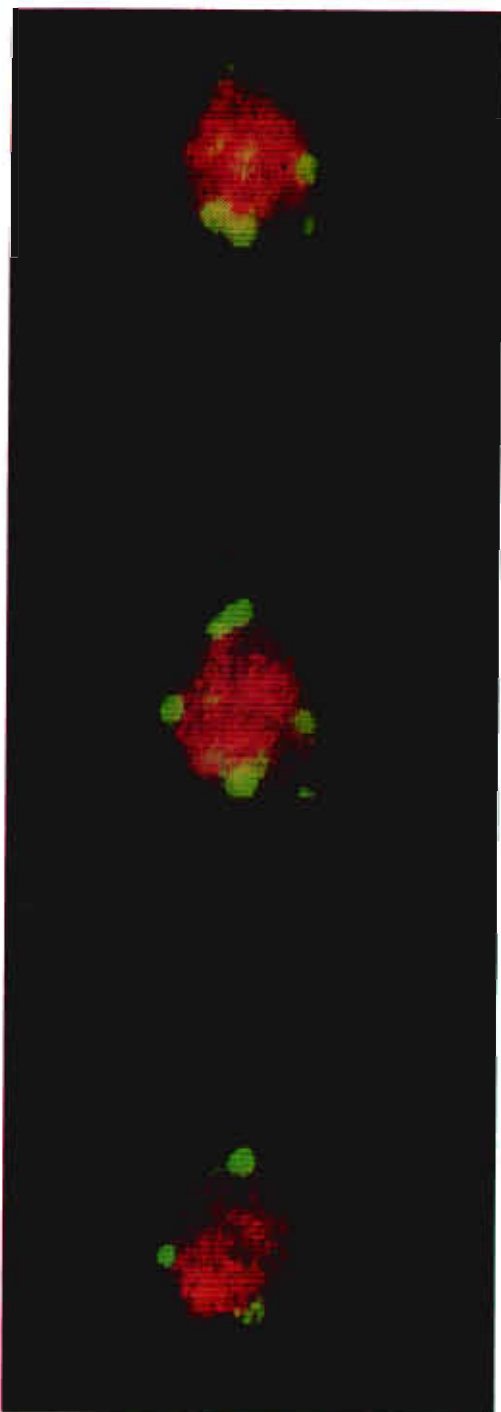


FIGURA 17-10. Microscopia de rastreo confocal de tres cortes ópticos de $0.3\ \mu\text{m}$ de espesor a través del núcleo de una levadura teñido con dos anticuerpos diferentes marcados con fluorescencia. (Véase la figura 12-22 para el análisis del contenido de la micrografía.) (Según Thierry Laroche y Susan M. Gasser, *Cell* 75:543, 1993, con permiso de Cell Press.)

un cubreobjetos sobre el tejido empleando un medio de montaje con el mismo índice de refracción de la laminilla de vidrio del portaobjetos y del cubreobjetos.

17-2 Microscopio de transmisión electrónica

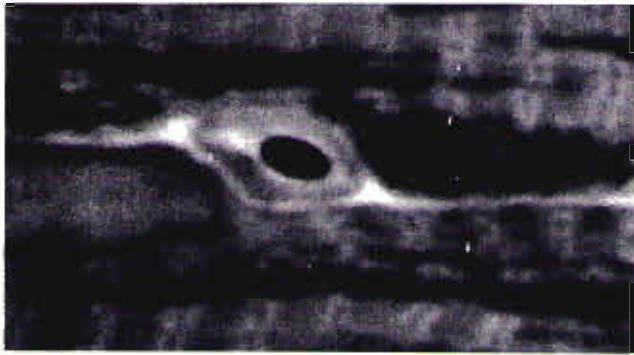
Se han desarrollado básicamente dos tipos diferentes de microscopio electrónico: el **microscopio de transmisión electrónico (MTE)**, que forma imágenes a partir de electrones transmitidos a través de una muestra, y el **microscopio electrónico tridimensional (MET)**, que utiliza los electrones que rebotan de la superficie de la muestra. Todos los comentarios expresados en esta sección del capítulo se refieren al empleo del MTE; el MET se estudia por separado en la página 713.

El microscopio de transmisión electrónico suministra una resolución mucho mayor que el microscopio de luz, según se ilustra comparando las dos fotografías de la figura 17-11 tomadas de cortes adyacentes del mismo tejido a la misma amplificación utilizando estos dos tipos de microscopio. La fotografía de la figura 17-11, *a*, se aproxima al límite de resolución del microscopio de luz, y la fotografía de la figura 17-11, *b*, es ejemplo de micrografía electrónica de muy baja potencia. El gran poder de resolución del microscopio electrónico deriva de las propiedades ondulatorias de los electrones. La ecuación para el límite de resolución de una lente, $D = 0.61 \lambda / (n \text{ seno } \theta)$, indica claramente la importancia de la longitud de onda de la radiación luminosa. A diferencia de un fotón, la longitud de onda de un electrón no es una distancia constante, sino que se relaciona con la velocidad a la cual viaja la partícula, que a su vez depende del voltaje acelerador aplicado al microscopio. Esta relación se define por la ecuación

$$\lambda = \sqrt{150/V}$$

donde λ es la longitud de onda en angstroms y V es el voltaje de aceleración en voltios. El MTE opera con un voltaje que va de 10 000 a 100 000 V. A 60 000 V, la longitud de onda de un electrón es de aproximadamente $0.05\ \text{\AA}$. Si se sustituye la abertura numérica alcanzable con el microscopio de luz en la ecuación de arriba para calcular D , el límite de resolución sería de casi $0.03\ \text{\AA}$. Cuando se considera que la distancia típica entre el centro de los átomos de una molécula es del orden de $1\ \text{\AA}$, el resultado es sorprendente. En realidad, la resolución alcanzable con el microscopio electrónico es casi dos órdenes de magnitud menos que su límite teórico. La razón es el difícil problema de la aberración esférica que sufre la lente encargada de enfocar los electrones, cuya solución requiere que la abertura numérica de la lente sea muy pequeña (en general entre 0.01 y 0.001). El límite práctico de resolución de los MTE estándar se encuentra en el intervalo de 3 a $5\ \text{\AA}$. Cuando se observa una estructura celular, el verdadero límite de ordinario se encuentra en el intervalo de 10 a $15\ \text{\AA}$.

El microscopio electrónico consta principalmente de una alta columna cilíndrica hueca donde se confina el rayo de electrones, y de una consola con un panel de botones giratorios que controlan electrónicamente las operaciones efectuadas dentro de la columna. La parte superior de la columna contiene el cátodo, un filamento de tungsteno que cuando se calienta actúa como fuente de electrones. Los electrones se desprenden del filamento caliente y se aceleran para



(a)



(b)

FIGURA 17-11. Comparación de la información contenida en imágenes tomadas con microscopio de luz y con microscopio electrónico a amplificación comparable de 4 500 veces el tamaño real. *a)* Fotografía de tejido muscular esquelético integrada en plástico, seccionada a un espesor de $1\ \mu\text{m}$, y fotografiada con un microscopio de luz bajo lente objetivo de inmersión en aceite. *b)* Corte adyacente al usado para la parte *a* cortado a $0.025\ \mu\text{m}$ y examinado con microscopio electrónico con amplificación comparable a la utilizada en *a*. La imagen resultante muestra un incremento de resolución de 100 a 200 veces. Nótese la diferencia en los detalles de las miofibrillas musculares, mitocondrias y el eritrocito contenido en los capilares. Aunque el microscopio de luz no pudiera suministrar información adicional alguna a la obtenida en *a*, el microscopio electrónico suministraría mucha mayor información, produciendo imágenes, por ejemplo, de la estructura de membranas individuales dentro de una pequeña porción de una de las mitocondrias (como en la figura 5-22). (Cortesía de Douglas E. Kelly y M.A. Cahill.)

formar un delgado haz mediante la aplicación de un voltaje entre el cátodo y el ánodo. Antes de la operación se extrae el aire de la columna para producir un vacío donde se desplazarán los electrones. Si no se extrae el aire, los electrones pueden dispersarse prematuramente por colisión con las moléculas de gas.

Puesto que los electrones son partículas con carga eléctrica, se pueden desviar de su trayectoria y poner en foco mediante un campo magnético. Las lentes de un microscopio electrónico son electroimanes potentes localizados en la pared de la columna que rodea el centro de la columna al vacío. La fuerza de los imanes está controlada por la corriente suministrada, que a su vez es determinada por la posición de los diferentes botones de la consola. En la figura

17-12 se comparan los sistemas de lentes de un microscopio de luz y de un microscopio electrónico. Entre la fuente de electrones y la muestra se colocan lentes condensadores que se encargan de enfocar el rayo de electrones sobre la muestra. La propia muestra se sostiene sobre una pequeña rejilla de metal delgado ($3\ \text{mm}$ de diámetro), que se introduce con pinzas en un soporte para la rejilla, el cual se introduce en la parte media de la columna del microscopio de modo que la rejilla se mantenga perpendicular al haz de electrones.

Puesto que la distancia focal de las lentes de un microscopio electrónico se puede modificar cambiando la corriente suministrada, una lente objetivo puede recorrer toda la gama de amplificaciones sin necesidad de cambiar lentes, como en el microscopio de luz. Igual que en el microscopio de luz, la imagen producida por la lente objetivo sirve como objeto para un sistema adicional de lentes. La imagen suministrada por la lente objetivo se amplifica unas 100 veces, pero a diferencia del microscopio de luz, los detalles presentes en esta imagen son suficientes para amplificarlos unas 10 000 veces más, lo que permite apreciar con la vista la información contenida. Modificando la corriente aplicada a las diferentes lentes del microscopio se puede variar la amplificación desde casi 1 000 hasta 250 000 veces. La imagen que el observador ve es resultado de los electrones que pasan a través de la muestra enfocados sobre una pantalla localizada en la parte inferior de la columna. Los electrones que golpean la pantalla excitan un recubrimiento de crista-

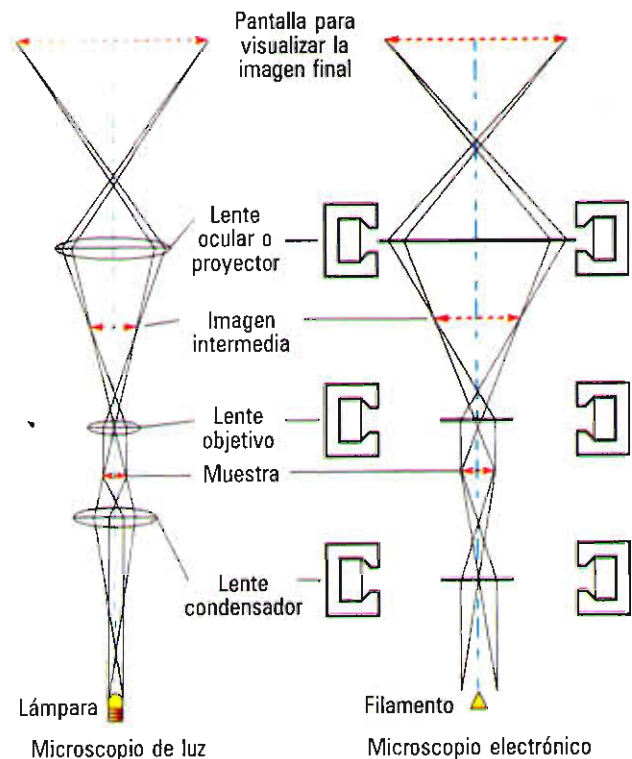


FIGURA 17-12. Comparación de los sistemas de lentes de los microscopios de luz y electrónicos. (Según W. Agar, *Principles and Practice of Electron Microscope Operation*, Elsevier North-Holland, 1974.)

les fluorescentes que emiten su propia luz visible percibida por el ojo como una imagen de la muestra.

La formación de una imagen en el microscopio electrónico depende de la dispersión diferencial de electrones por las partes de la muestra. Consideremos un haz de electrones emitidos por el filamento y enfocados sobre la pantalla por la lente. En ausencia de una muestra, todo el campo será uniformemente brillante, iluminado de manera homogénea por el haz de electrones que incide sobre la pantalla. Cuando se coloca una muestra en la trayectoria del haz, un porcentaje de electrones golpea los átomos de la muestra y se dispersan alejándose en cierto ángulo. Los electrones que rebotan de la muestra no atraviesan la abertura sumamente pequeña situada atrás del plano focal de la lente objetivo, y por lo tanto se pierden y no participan en la formación de la imagen.

La dispersión de electrones por una porción de la muestra es proporcional a la cantidad de materia presente en dicha porción, o sea, su *espesor de masa*, que es una medida del número de átomos por unidad de área y de su densidad atómica. Puesto que el material insoluble de las células consta de átomos de número atómico relativamente bajo, como carbono, oxígeno, nitrógeno e hidrógeno, el material biológico posee muy poca capacidad intrínseca para dispersar electrones. Para lograr un buen contraste se confiere densidad atómica a la muestra fijando y tiñendo el tejido con soluciones de metales pesados (descrito más adelante). Estos metales penetran en la estructura de las células y forman complejos selectivamente con diferentes partes de los organelos. Es indispensable una afinidad diferencial por los metales, porque si cada parte de una célula se une a los átomos de metal con la misma intensidad, todo el campo mostraría densidad uniforme y no se produciría imagen alguna. Las partes de las células con mayor concentración de átomos metálicos permiten el paso de menor número de electrones que participarán en la formación de la imagen bajo la acción de las lentes. Cuanto menor sea el número de electrones enfocados sobre un punto determinado de la pantalla por unidad de tiempo más oscura será la pantalla en dicho punto, en tanto que cuanto mayor sea el número de electrones más brillante será el punto. La imagen se puede fotografiar desplazando la pantalla hacia afuera de la trayectoria de los electrones y permitiendo que éstos incidan sobre una placa fotográfica colocada en posición debajo de la pantalla. Puesto que la emulsión fotográfica es directamente sensible a los electrones, casi igual que a la luz, se puede registrar sobre la película una imagen de la muestra.

Preparación de muestras para microscopio electrónico

En la mayor parte de los casos, los tejidos examinados en el microscopio electrónico deben fijarse, montarse en algún material y practicar cortes igual que con el microscopio de luz, aunque los pasos son diferentes. En tejidos para microscopio electrónico (fig. 17-13), la fijación es mucho más importante que para el microscopio de luz, puesto que los cortes se someten a escrutinio mucho mayor. El fijador debe

interrumpir la vida de la célula sin alterar de manera significativa la estructura de la misma. A nivel de resolución del microscopio electrónico, son muy aparentes los daños relativamente menores, como mitocondrias hinchadas o roturas del retículo endoplásmico. Para lograr una fijación más rápida y por lo tanto dañar menos a las células, se preparan pedazos muy pequeños de tejido. También es indispensable que el fijador no genere estructuras artificiales ausentes en la célula viva. Los fijadores son sustancias químicas que desnaturalizan y precipitan a las macromoléculas de la célula. Las sustancias químicas capaces de esta acción pueden coagular o precipitar materiales que en la célula viviente carecen de estructura, y formar un **artefacto**. El mejor argumento de que una estructura particular no es un artefacto es demostrar su existencia en células fijadas con diferentes técnicas, o todavía mejor, sin fijador alguno. En este último caso el tejido se congela de inmediato en vez de fijarlo con sustancias químicas, y se utilizan técnicas especiales para revelar su estructura (véase duplicación de fracturas por congelación, descrita más adelante). Los fijadores más comunes para observaciones con microscopio electrónico son glutaraldehído y tetróxido de osmio; este último es un metal pesado que no sólo fija a la célula, sino que además le confiere propiedades para dispersar un colorante electrónicamente denso.

Una vez fijado el tejido, se le debe extraer el agua mediante deshidratación sumergiéndolo en soluciones de concentración alcohólica creciente, y llenar los espacios entre el tejido con un material que soporte los cortes efectuados en el mismo. La observación en microscopio electrónico demanda como requisito que los cortes examinados sean muy delgados. Con la mayor parte de las ceras empleadas para microscopio de luz es difícil obtener cortes más delgados que $5\ \mu\text{m}$, en tanto que los cortes para microscopio electrónico deben ser menores de $0.1\ \mu\text{m}$ (espesor equivalente a casi cuatro ribosomas). Estos cortes son tan pequeños y delgados que si todas las secciones cortadas por un microscopista electrónico durante su vida se apilaran una sobre otra, probablemente serían equivalentes a menos 1 cm cúbico.

Desde 1961, el medio de material para embeber muestras es un plástico epóxico llamado Epon. Se dispone de varios ultramicrotomos capaces de seccionar este plástico con el tejido que contiene a un espesor suficiente (0.02 a $0.1\ \mu\text{m}$) para examinar en el microscopio electrónico. Los cortes se obtienen deslizando lentamente el bloque de plástico sobre el borde sumamente afilado de una cuchilla (fig. 17-13) elaborada a base de vidrio o la arista de un diamante finamente pulido. Los cortes que se desprenden del borde de la cuchilla flotan sobre la superficie del agua contenida en un depósito situado justamente por debajo del borde de la cuchilla. A continuación se recogen los cortes con la rejilla para muestra y se secan. El tejido se tiñe haciendo flotar la rejilla sobre gotas de soluciones de metal pesado, principalmente acetato de uranilo y citrato de plomo, que proporcionan masa con el espesor necesario para dispersar el rayo de electrones. Además de los colorantes estándar, los cortes de tejido se pueden tratar con anticuerpos marcados con metal u otros materiales capaces de reaccionar con moléculas específicas en el corte de tejido. También se dispone de al-

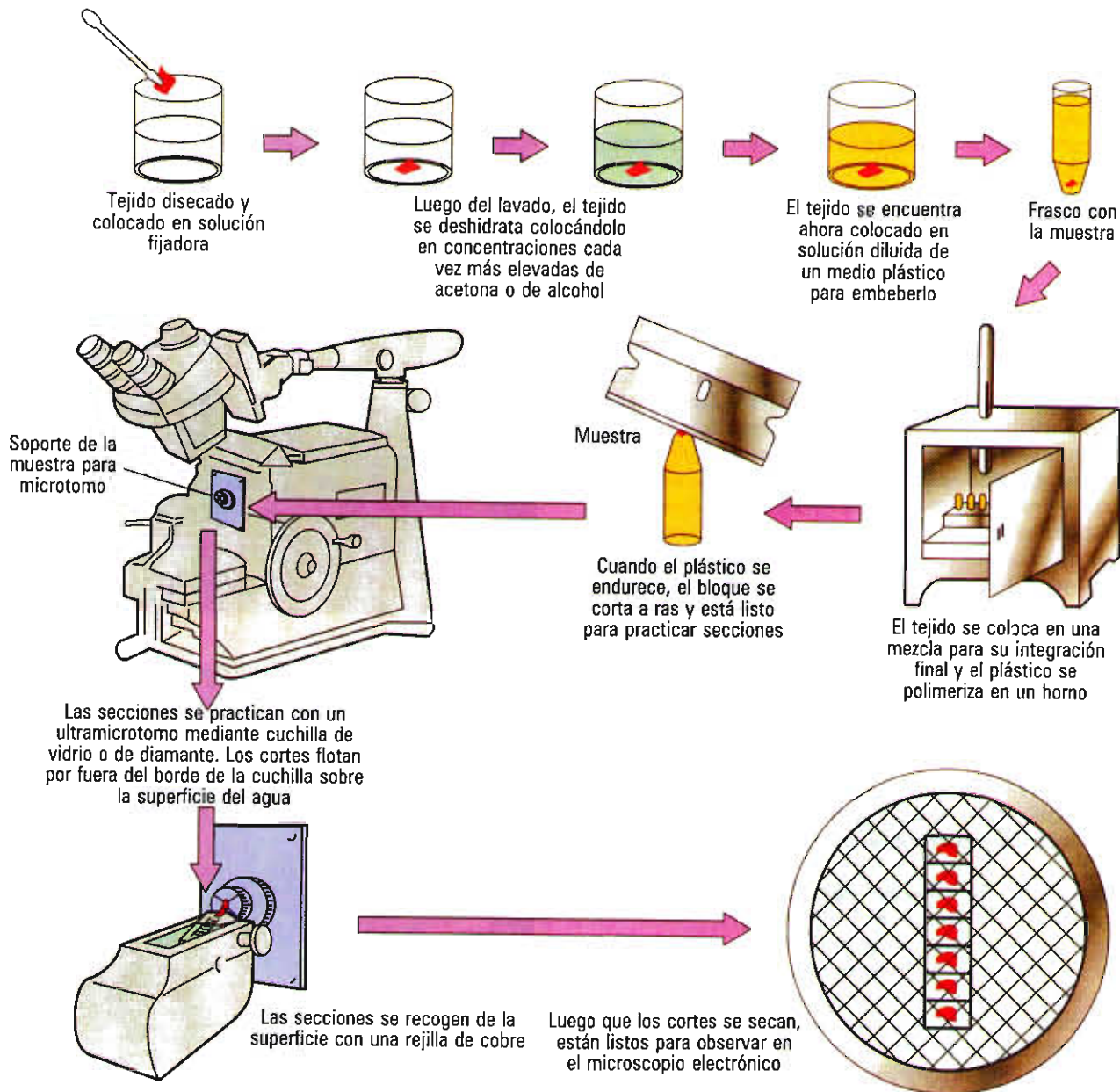


FIGURA 17-13. Preparación de una mezcla para observación en el microscopio electrónico. (Según W.A. Jensen y R.B. Park, *Cell Ultrastructure*, © 1967; Wadsworth, reimpresso con permiso del editor.)

gunos procedimientos citoquímicos, como el descrito en la página 302, para determinar la presencia de fosfatasa ácida.

Tinción negativa

El microscopio electrónico también es muy adecuado para examinar partículas materiales sumamente pequeñas, incluyendo agregados de peso molecular elevado como virus, ribosomas, enzimas de múltiples subunidades, elementos del citoesqueleto y complejos con proteína. Además, puede resolver la forma de proteínas y ácidos nucleicos individuales siempre y cuando presenten contraste suficiente

en relación con las estructuras circunvecinas. Una de las mejores maneras de hacer visibles estas sustancias es emplear procedimientos de **tinción negativa**, en los cuales el metal pesado se deposita sobre toda la rejilla que sostiene la muestra, excepto en los sitios donde hay partículas. Como resultado, la estructura de la muestra destaca por su brillo relativo sobre la pantalla fluorescente. Para este procedimiento se coloca una gota de la solución de tinción (acetato de uranilo o fosfotungstato de potasio) sobre una rejilla que contiene las partículas que deben examinarse y se permite evaporar la mayor parte de la gota hasta sequedad. Como consecuencia de la tensión superficial, la tinción suele ro-

dear la partícula sobre la película de apoyo y penetrar en todas las irregularidades abiertas en la superficie de la partícula. El resto de la partícula acumula poca tinción. El método es particularmente satisfactorio para revelar la organización de cualquier subunidad dentro de la partícula. En la figura 17-14, *a*, se muestra un ejemplo de una muestra teñida en negativo.

Moldeado de sombras

Otra técnica ampliamente utilizada para hacer visibles partículas muy pequeñas es emplear dichas partículas como objetos para moldear su sombra. La técnica se describe en la figura 17-15. Las plantillas se colocan en una cámara sellada en donde se ha practicado el vacío. En la cámara se encuentra un filamento compuesto de un metal pesado (de ordinario platino) y carbón. El filamento se calienta a temperatura elevada provocando su evaporación y depósito de un recubrimiento metálico sobre las superficies accesibles dentro de la cámara. Como resultado, el metal se deposita sobre las superficies enfrentadas al filamento, en tanto que las superficies opuestas de la muestra y el espacio que ocupa la rejilla en su sombra carecen de revestimiento y no pueden dispersar electrones. Por consiguiente, las áreas dentro de la sombra aparecen brillantes sobre la pantalla, en tanto que las regiones revestidas de metal aparecen de color oscuro. Esta relación se invierte sobre una placa fotográfica, que es un negativo de la imagen. La convención para ilustrar las sombras de las muestras es imprimir una imagen negativa en la cual aparece la partícula iluminada por una luz blanca brillante (correspondiente a la superficie recubierta) con una sombra del relieve de la partícula de color oscuro (fig. 17-14, *b*). Esta técnica suministra un excelente contraste para materiales aislados y produce un efecto tridimensional.

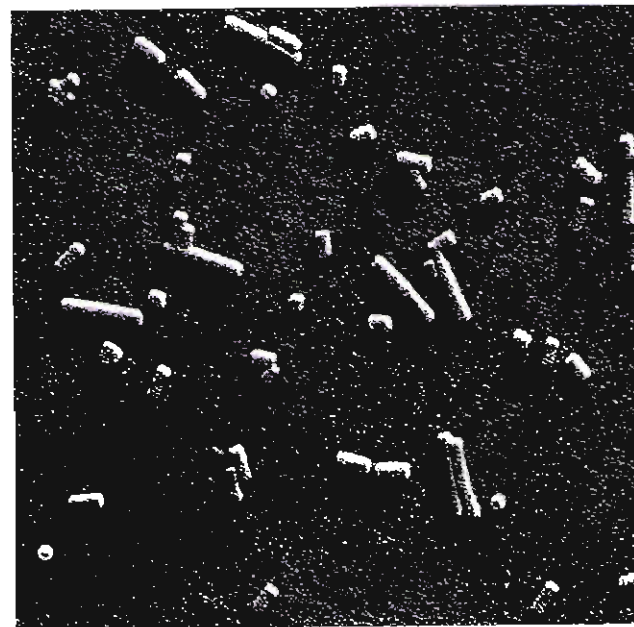
Duplicación de fracturas por congelación y congelación al "aguafuerte"

En varias técnicas para examen microscópico se emplean tejidos congelados rápidamente en ausencia de fijador o después de fijación. Para evitar el daño producido por la formación de cristales de hielo, el tejido se infiltra con ciertos compuestos, como glicerol, y luego se congela rápidamente en líquidos de muy baja temperatura de congelación (como freón líquido, punto de fusión -150°C), o colocando la muestra contra un bloque de metal enfriado con helio líquido. El tejido congelado casi siempre se observa mediante la técnica de **duplicación de fracturas por congelación**, ilustrada en la figura 17-16. Se colocan pedazos pequeños de tejido sobre un disco metálico y luego se congelan rápidamente, como se describió antes. A continuación el disco se coloca en un soporte especial y se golpea el bloque de tejido congelado con el borde de una cuchilla, provocando un plano de fractura o fisura que se extiende a partir del punto de contacto desdoblado el tejido en dos partes.

Consideremos lo que ocurre a medida que un plano de fractura avanza a través de una célula compuesta de gran variedad de organelos diferentes. Estas estructuras tienden a desviar el plano de fractura hacia arriba o hacia abajo, lo que provoca la formación de elevaciones y depresiones en las superficies del plano de fractura que reflejan el contorno



(a)



(b)

FIGURA 17-14. Ejemplos de muestras teñidas en negativo y sombreado metálico. Micrografías electrónicas de un virus cascabel del tabaco luego de tinción negativa con fototungstato de potasio (*a*) o molde sombreado con cromo (*b*). (Cortesía de M. K. Corbett.)

del protoplasma atravesado. En otras palabras, la superficie expuesta por la fractura contiene información acerca del contenido de la célula. El objetivo es hacer visible esta información. Esto se logra mediante el proceso de duplicación utilizando la superficie de fractura como una plantilla sobre

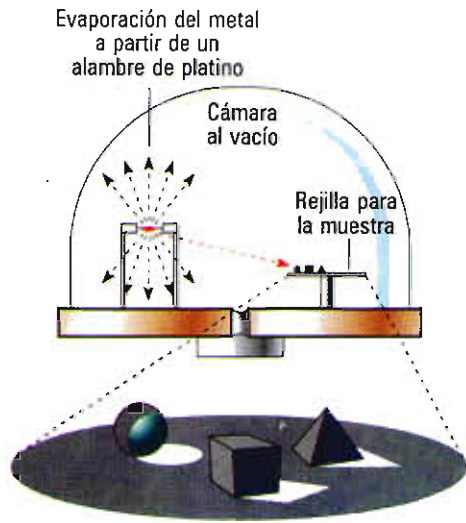


FIGURA 17-15. Procedimiento para moldeado de sombras como medio para suministrar contraste en el microscopio electrónico. Este procedimiento se emplea con frecuencia para visualizar partículas muy pequeñas, como los virus mostrados en la figura previa. Las moléculas de DNA y RNA casi siempre se hacen visibles mediante una modificación de este procedimiento, conocida como *sombreado rotatorio*, en el cual se evapora el metal a un ángulo muy pequeño en tanto la muestra va girando.

la cual se deposita una capa de metal pesado. El metal pesado se deposita sobre la superficie recién expuesta de tejido congelado dentro de la misma cámara a medida que ocurre la fractura. El metal se deposita a cierto ángulo y genera sombras que acentúan la topografía local (fig. 17-16, b), según se describe en la sección acerca de moldeado de sombra.

A continuación se deposita una capa de carbón sobre la capa metálica dejando caer el carbón verticalmente, más bien que en ángulo, de modo que se forma una capa uniforme para reunir los parches de metal en una capa sólida. Después de formar un molde de la superficie se puede retirar, retirar y desechar el tejido que sirvió de plantilla; la **réplica metal-carbón** se coloca sobre la rejilla para muestras y se observa con el haz de electrones. Las variaciones de espesor del metal sobre las diferentes partes de la réplica provocan cambios en el número de electrones incidentes que alcanzan la pantalla del microscopio y suministran el contraste necesario en la imagen. Como se estudió en el capítulo 4, los planos de fractura recorren el camino de menor resistencia a través del bloque congelado, lo que con frecuencia los conduce a pasar por el centro de las membranas celulares. Por consiguiente, esta técnica es particularmente adecuada para examinar el interior de las membranas (pág. 135).

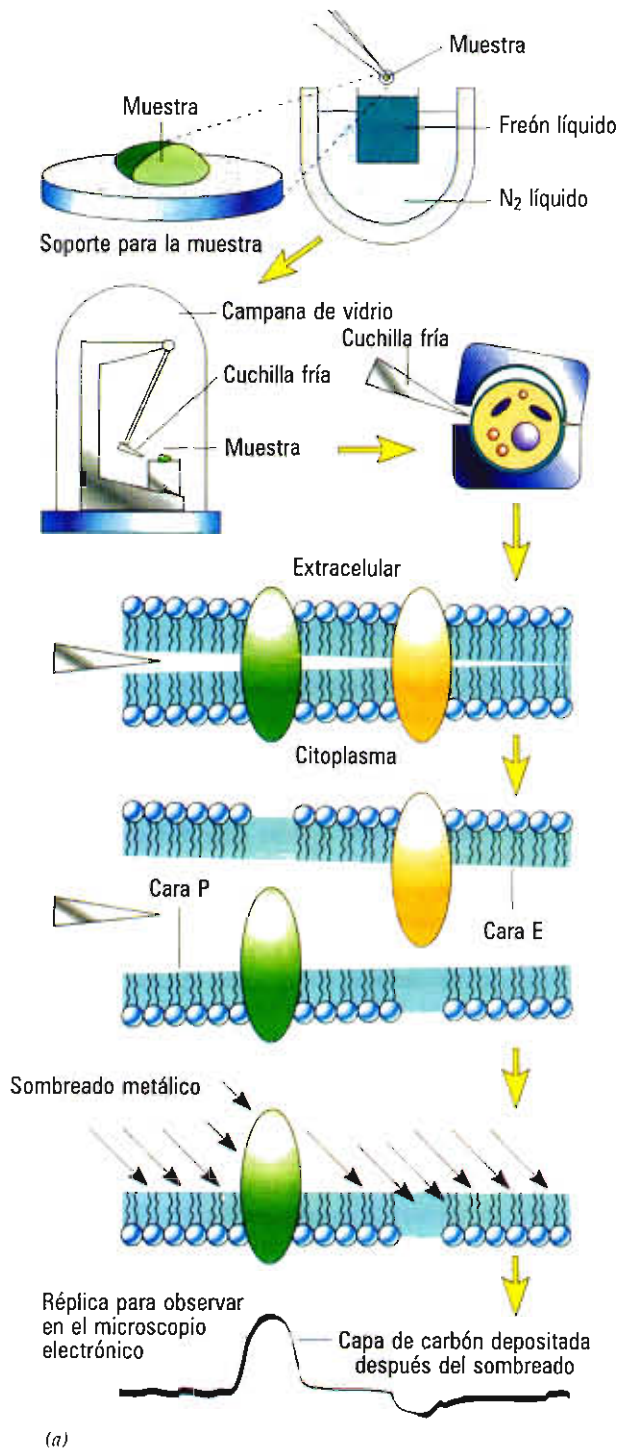
La duplicación de fractura por congelación representa en sí una técnica sumamente valiosa, pero puede proporcionar aún mayor información si se incluye una etapa denominada **congelación "al aguafuerte"**. En esta etapa, la muestra congelada y fracturada, aun en su sitio dentro de la cámara de congelación, se expone a vacío y temperatura elevada por uno o unos pocos minutos, durante los cuales

se puede evaporar una capa de hielo (sublimar) de la superficie de la muestra. Luego de quitar el agua circunvecina se puede recubrir la superficie de la estructura con metal pesado (fig. 4-19). A fines del decenio de 1970 se desarrolló la técnica de aguafuerte profundo con congelación inmediata, con lo que se logró una nueva visión fascinante de los organelos celulares. En las figuras 17-17 y 9-49 se muestran ejemplos de muestras preparadas con esta técnica. En cada caso se observa la estructura celular con todas sus partes en relieve profundo contra el fondo. Esta técnica suministra muy alta resolución y se puede emplear para revelar la forma de complejos macromoleculares, como microfilamentos, microtúbulos y agregados de proteínas de membrana en la forma que se supone existe dentro de la célula viva.

17-3 Microscopio electrónico tridimensional

Aunque el ME de transmisión se utiliza más ampliamente para examinar estructuras internas de las células, el ME tridimensional constituye el medio para examinar con gran claridad y detalle la superficie de objetos cuyo tamaño va desde un virus hasta la cabeza de un animal (fig. 17-18). La construcción y operación del MET son muy diferentes comparadas con el MTE. La preparación de una muestra para MET tiene como objetivo producir un objeto con forma y propiedades de superficie iguales a las del estado viviente, pero totalmente deshidratado. Puesto que el agua constituye un porcentaje muy elevado del peso de las células vivientes y se presenta prácticamente en toda macromolécula, eliminarla puede tener un efecto muy destructivo sobre la estructura celular. Cuando las células se secan simplemente al aire, la destrucción se produce por efecto de la tensión superficial en las interfases aire-agua. Las muestras para examinar con el MET generalmente se preparan mediante la técnica de *secado hasta el punto crítico*, que se basa en la existencia de una temperatura y presión críticas para cada solvente dentro de un recipiente cerrado donde la densidad de vapor sea igual a la densidad de líquido. En este punto no hay tensión superficial entre el gas y líquido. El solvente de la célula se sustituye con un fluido de transición en estado líquido (por lo general dióxido de carbono), que se vaporiza bajo presión de modo que las células no se expongan a tensión superficial alguna que podría deformar su configuración tridimensional.

Una vez deshidratada la muestra se recubre con una capa de carbón y luego otra de metal (en general oro u oropaldio), que la convierte en "blanco" adecuado para un haz de electrones. En el MTE, la lente condensador enfoca el rayo de electrones para iluminar simultáneamente todo el campo visual. En el MET, los electrones se aceleran y forman un haz delgado (5 nm de diámetro) que rastrea la muestra. En el MTE, los electrones que forman la imagen son los que atraviesan la muestra. En el MET, la imagen se forma por electrones reflejados hacia atrás a partir de la muestra (retrodispersión) o por electrones secundarios desprendidos de la muestra luego que son golpeados por el haz de electrones primarios. Estos electrones inciden so-



bre un detector localizado cerca de la superficie de la muestra.

En el MET la imagen se forma indirectamente comparada con la del MTE. Además del haz que rastrea la superficie de la muestra, otro haz de electrones en movimiento lo hace frente al tubo de rayos catódicos. La imagen observada sobre este tubo se parece a la imagen vista en una pan-



(b)

FIGURA 17-16. Réplicas de fracturas por congelación. a) Procedimiento para la formación de réplicas de fracturas por congelación según se describe en el texto. b) Réplica de una fractura por congelación en una célula de raíz de cebolla mostrando la envoltura nuclear (NE) con sus poros (NP), el complejo de Golgi (G) y una vacuola citoplásmica (V), y la pared celular (CW). (b: Cortesía de Daniel Branton.)

talla de televisión. Los electrones que rebotan de la muestra y alcanzan el detector controlan directamente la intensidad de la señal del rayo situado dentro del tubo de rayos catódicos. Cuantos más electrones procedentes de la muestra se acumulen en un punto determinado, más fuerte será la señal al tubo y mayor la intensidad del rayo sobre la pantalla en el punto correspondiente. El resultado es una imagen que refleja la topología de la superficie de la muestra, puesto que esta topología (grietas, prominencias y depresiones) determina el número de electrones recopilados en las diferentes partes de la superficie.

Las propiedades más notables del MET son su extensa gama de amplificación y la tremenda profundidad de su foco, unas 500 veces mayor que el del microscopio de luz a una amplificación correspondiente. Esta propiedad confiere a las imágenes MET su calidad tridimensional. Más importante aún, a nivel celular, el MET permite visualizar la superficie externa de la célula y las diferentes prolongaciones, extensiones y materiales extracelulares que participan en las interacciones de la célula con su medio.

17-4 Uso de radioisótopos

Un *trazador* es una sustancia que manifiesta su presencia de alguna manera y por lo tanto permite a un investigador

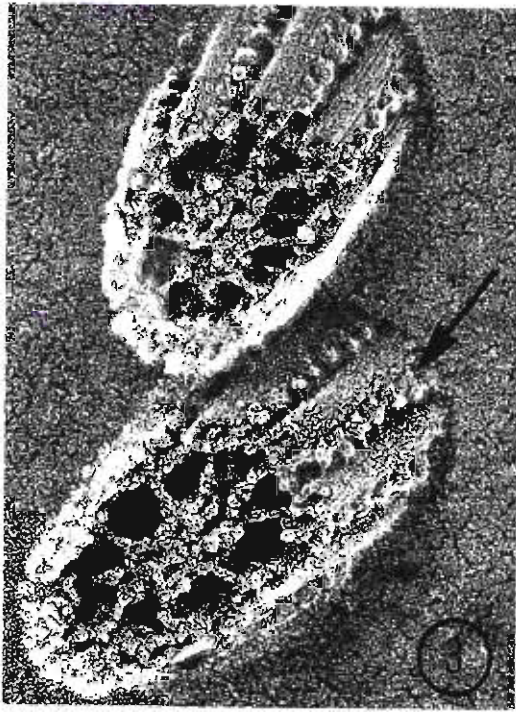


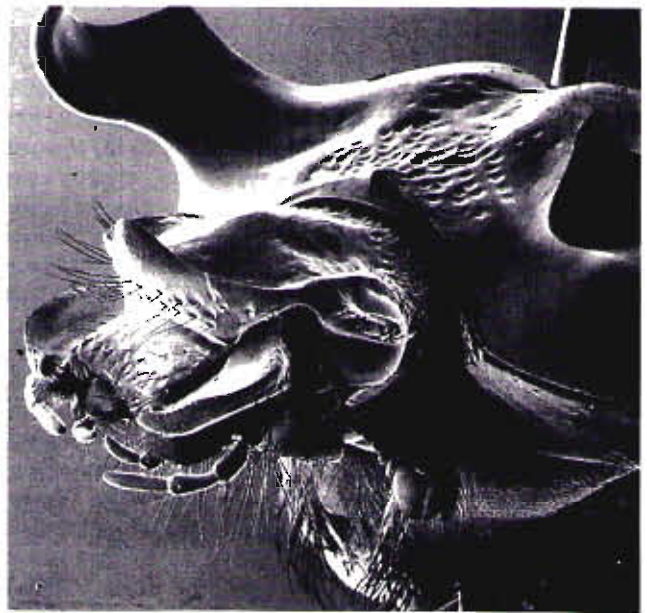
FIGURA 17-17. Aguafuerte profundo. Micrografía electrónica de un axonema ciliar del protozoo *Tetrahymena*. Los axonemas se fijaron, congelaron y fracturaron, y el agua congelada en la superficie del bloque fracturado se evaporó dejando el relieve de una porción del axonema, según se observa en esta réplica metálica. La flecha indica una línea distinguible de los brazos de dineína externos. (Según Ursula W. Goodenough y John E. Heuser, *J. Cell Biol.* 95:800, 1982; con permiso de Rockefeller University Press.)

seguirla durante un experimento. A todo lo largo de este libro se han mencionado trazadores electrónicamente densos, fluorescentes, con giro visible, con densidad marcada y, con mayor frecuencia, trazadores marcados con isótopos radiactivos. Cada uno de estos tipos de trazadores confiere al grupo marcado la posibilidad de ser detectados dentro de una molécula sin afectar la especificidad de sus interacciones. Por ejemplo, no se pueden conocer las diferencias entre una molécula de glucosa 6-fosfato que contiene un átomo de hidrógeno, carbono o fosfato radiactivo en vez de uno de estos átomos no radiactivo. Las moléculas radiactivas participan en las mismas reacciones que las especies no radiactivas, pero se puede seguir y cuantificar su presencia.

La identidad de un átomo (de hierro, cloro o algún otro tipo), y por lo tanto sus propiedades químicas, están definidas por el número de protones con carga positiva en su núcleo. Todos los átomos de hidrógeno tienen un solo protón, los átomos de helio dos protones, los átomos de litio tres protones, y así sucesivamente. Sin embargo, no todos los átomos de hidrógeno, helio o litio tienen el mismo número de neutrones. Los átomos que poseen igual número de protones y diferente número de neutrones se dice que son **isótopos** entre sí. Incluso el hidrógeno, el elemento más simple, puede existir en forma de tres isótopos diferentes, según si el átomo tiene 0, 1 o 2 neutrones en su núcleo. De



(a)



(b)

FIGURA 17-18. Microscopio electrónico tridimensional. Micrografía electrónica tridimensional de: a) bacteriófago T4 ($\times 275\,000$) y b) cabeza de un insecto ($\times 40$). (a: Reimpreso con permiso de A.N. Broers, B.J. Panessa y J.F. Gennaro, *Science* 189:635, 1975; copyright 1975 American Association for the Advancement of Science; b: cortesía de H.F. Howden y L.E.C. Ling.)

estos tres isótopos de hidrógeno, sólo el que contiene dos neutrones es radiactivo; se le conoce como tritio (^3H).

Los isótopos son radiactivos cuando contienen una combinación inestable de protones y neutrones. Esta inestabilidad confiere al átomo una tendencia a fragmentarse y alcanzar así una configuración más estable. La desunión o desintegración de un isótopo radiactivo da como resultado la liberación de energía en forma de una partícula o radiación electromagnética, y ambas pueden reconocerse mediante sistemas de detección apropiados. Los isótopos radiactivos se encuentran a través de toda la tabla periódica de los elementos, y también se pueden producir en el laboratorio a partir de elementos no radiactivos. Por consiguiente, es posible obtener casi cualquier tipo de molécula biológica en estado radiactivo, o sea, que contenga uno o más átomos radiactivos como parte de su estructura. Además de la identidad del elemento, las propiedades más importantes de un isótopo radiactivo son: 1) el tipo de radiación que emite; 2) la energía de la radiación, y 3) la vida media del isótopo.

Durante su desintegración, los átomos pueden liberar tres formas principales de radiación. El átomo puede liberar una **partícula alfa**, que consta de dos protones y dos neutrones y equivale al núcleo de un átomo de helio; una **partícula beta**, que equivale a un electrón, o ambos tipos de partículas simultáneamente; y **radiación gamma**, que consiste en radiación electromagnética o fotones, de manera aislada o junto con las dos partículas anteriores.

De los tres tipos de radiación, las partículas alfa son la de menor energía y los "rayos" gamma los de mayor energía. Casi todos los isótopos de importancia biológica emiten partículas beta, el tipo de radiación más fácil de detectar y cuantificar, y el único tipo que consideraremos en el siguiente análisis. Las partículas beta contienen energía que varía desde muy débil, como la emitida por el átomo de tritio (0.018 millones de eV), hasta energías muy elevadas, como la emitida por el átomo ^{32}P (1.71 millones eV). Esta diferencia del contenido de energía se manifiesta en la distancia que la partícula beta viaja antes de detenerse, valor conocido como *longitud de vía* y su poder de penetración. Aunque la partícula beta emitida por un átomo ^3H sólo viaja unos pocos micrómetros y no puede penetrar las paredes de un recipiente de vidrio, la partícula beta procedente de un átomo ^{32}P puede atravesar una habitación, de modo que las soluciones altamente radiactivas se mantienen en el laboratorio detrás de una placa de plomo para proteger a los trabajadores.

La **vida media** ($t^{1/2}$) de un isótopo radiactivo es una medida de su inestabilidad. Cuanto más inestable sea un isótopo particular, mayor será la probabilidad de que un átomo determinado se desintegre en cierto tiempo. Si se comienza con un Curie¹ de tritio, la mitad del material radiactivo se perderá en unos 12 años (esta es la $t^{1/2}$ de este radioisótopo). La vida media de una sustancia de ordinario no es muy importante en investigaciones biológicas, siempre y cuando sea lo bastante prolongada para permitir su empleo en estudios individuales. En los primeros años de

investigación en fotosíntesis y otras vías metabólicas, el único isótopo de carbono disponible fue ^{14}C , con una vida media aproximada de 20 minutos. Los experimentos con ^{14}C fueron literalmente realizados de prisa, de modo que la cantidad de isótopo incorporada pudiera medirse antes que la sustancia casi desapareciera. No es sorprendente que la disponibilidad del ^{14}C , un radioisótopo con vida media de 5 700 años, fuera celebrada con gran júbilo. Los radioisótopos de mayor importancia en investigaciones de biología celular se muestran en el cuadro 17-1, junto con la información acerca de su vida media y naturaleza de su radiación.

Los isótopos radiactivos se emplean extensamente por la facilidad para detectarlos y cuantificarlos con precisión. Los isótopos de uso más común son los emisores beta, que se pueden determinar con dos técnicas diferentes: espectrometría de centelleo líquido y autorradiografía. Se emplea un contador de centelleo líquido cuando se quiere determinar la cantidad de radiactividad en una muestra determinada, como la contenida en una fracción tomada del gradiente de sacarosa mostrado en la figura 17-32, c. En contraste, la autorradiografía se emplea cuando se desea conocer dónde se localiza un isótopo particular, sea en una célula, en un gel de poliacrilamida o en un filtro de nitrocelulosa. En la siguiente sección estudiaremos la autorradiografía.

La **espectrometría de centelleo líquido** se basa en la propiedad de ciertas moléculas, llamadas *fosforescentes* o *centelleantes*, para absorber parte de la energía de una partícula emitida y liberar esa energía en forma de luz. En la preparación de muestras para centelleo líquido, la solución del fosforescente se mezcla con la muestra en un recipiente de vidrio o de plástico especial para centelleo. Así, el fosforescente y el isótopo radiactivo entran en contacto muy estrecho, de modo que se pueda medir con eficacia la radiación aun de los emisores beta más débiles. Una vez hecha la mezcla se coloca el recipiente en el instrumento contador, donde descende a un pozo cuyas paredes están provistas de un dispositivo fotodetector sumamente sensible. La desintegración de átomos radiactivos dentro del frasco genera emisión de partículas que activan las partículas centelleantes que emiten destellos de luz. La luz se detecta y la señal se amplifica mediante un tubo fotomultiplicador situado dentro del contador. Luego de someter a detección electrónica para eliminar el ruido de fondo, la magnitud de la radiactividad presente en el frasco se revela en forma de cuentas por minuto sobre el aparato de registro del contador.

Autorradiografía

La autorradiografía es una técnica bien fundamentada para visualizar sitios donde se localiza la radiactividad en diferentes tipos de muestras, incluyendo células fijadas, gel de electroforesis o híbridos DNA-RNA contenidos en cortes. En la página 278 se describió la importancia de la autorradiografía en la búsqueda de información acerca de las actividades de síntesis en las células. En esos experimentos se incubaron células con aminoácidos marcados con isótopo radiactivo y se observó el destino de la radiactividad incorporada desde el sitio de ensamblado de la proteína

¹ Un Curie es la cantidad de radiactividad necesaria para producir 3.7×10^{10} desintegraciones por segundo.

CUADRO 17-1. Propiedades de algunos radioisótopos comúnmente usados en investigación biológica

Número atómico	Símbolo y peso atómico	Vida media	Tipo de partículas emitidas	Energía de la partícula (millones de eV)
1	^3H	12.3 años	Beta	0.018
6	^{11}C	20 min	Beta	0.981
	^{14}C	5 700 años	Beta	0.155
11	^{24}Na	15.1 hora	Beta	1.39
			Gamma	2.75, 1.37
15	^{32}P	14.3 días	Beta	1.71
16	^{35}S	87.1 días	Beta	0.167
19	^{42}K	12.4 horas	Beta	3.58, 2.04
			Gamma	1.395
20	^{45}Ca	152 días	Beta	0.260
26	^{59}Fe	45 días	Beta	0.460, 0.26
			Gamma	1.30, 1.10
27	^{60}Co	5.3 años	Beta	0.308
			Gamma	1.317, 1.115
29	^{64}Cu	12.8 horas	Beta	0.657, 0.571
			Gamma	1.35
30	^{65}Zn	250 días	Beta	0.32
			Gamma	1.11
53	^{131}I	8.0 días	Beta	0.605, 0.250
			Gamma	0.164, etc.

en el retículo endoplásmico rugoso hasta su salida al espacio extracelular por exocitosis (fig. 8-3).

En la autorradiografía se aprovecha que las partículas emitidas por un átomo radiactivo pueden activar una emulsión fotográfica, de igual manera que la luz o los rayos X pueden activar la emulsión que recubre un pedazo de película. Cuando se pone en íntimo contacto la emulsión fotográfica con una fuente radiactiva, las partículas emitidas por la fuente aparecen en la emulsión como minúsculos gránulos negros plateados al revelar la fotografía. La autorradiografía se emplea para localizar radioisótopos inmovilizados dentro de cortes de células y tejidos sobre una laminilla o una rejilla para micrografía electrónica. En la figura 17-19 se muestran los pasos para preparar una autorradiografía para microscopio de luz. La emulsión se aplica en forma de capa muy delgada que cubre los cortes colocados sobre la laminilla o la rejilla, y la muestra se coloca en un recipiente a prueba de luz para permitir que la emulsión sólo se exponga a las emisiones. Cuanto más tiempo se deje la muestra antes de revelar la película mayor será el número de gránulos plateados que se formen. Cuando se examina al microscopio la laminilla o la rejilla después del revelado, la localización de los gránulos plateados en la capa de emulsión justo arriba del tejido indica dónde se localiza la radiactividad en las células (fig. 17-20).

En la autorradiografía para localizar radioisótopos dentro de las células, la limitación más grave del microscopio electrónico es su resolución. En las células examinadas, la localización de los radioisótopos se determina por la posición de los gránulos plateados suprayacentes. Si los gránu-

los plateados son demasiado grandes en relación con el organelo donde se origina la radiactividad, puede ser imposible identificar el sitio desde el cual se emiten las partículas. De manera similar, la partícula emitida por la fuente radiactiva puede viajar cierta distancia desde su punto de origen antes de golpear la emulsión. Como resultado, la localización del gránulo plateado, o sea el sitio donde la partícula interactúa con la emulsión, puede ser cualquier distancia a partir de la fuente de emisión dentro del tejido. Por esta razón, sólo aquellos radioisótopos que emiten partículas cuya vía es de longitud corta, como ^3H y ^{14}C , son adecuados para uso amplio en autorradiografía microscópica.

17-5 Cultivo de células

A través de todo este libro hemos subrayado el enfoque de la biología celular en el que se intenta entender procesos particulares mediante el análisis *in vitro* de sistemas simplificados y controlados. El mismo enfoque se puede aplicar al estudio de las propias células, puesto que también se pueden aislar de las influencias a las cuales están sometidas normalmente dentro de un complejo organismo multicelular. La capacidad de las células para crecer fuera del organismo, o sea, en **cultivo de células**, es uno de los logros técnicos más valiosos en todo el estudio de la biología. Una rápida revisión de cualquier publicación periódica de biología celular revela que la mayor parte de los artículos describen investigaciones efectuadas en cultivo de células. Las

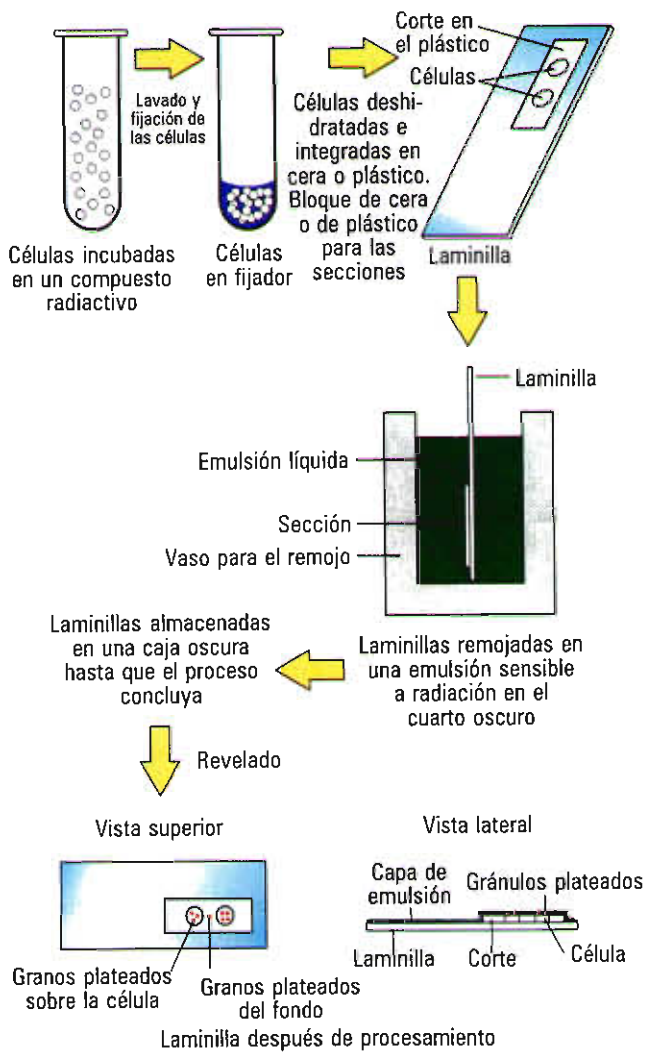


FIGURA 17-19. Procedimiento paso a paso para la preparación de una autorradiografía.

razones de esto son abundantes, incluyendo: la facilidad para obtener células en gran cantidad; el hecho de que la mayor parte de los cultivos sólo contienen un tipo único de célula; la amplia variedad de los diferentes tipos de células que pueden crecer en cultivo; el gran número de diferentes actividades celulares que se pueden estudiar, incluyendo endocitosis, movimiento celular, división de la célula, tráfico a través de la membrana y síntesis de macromoléculas; la oportunidad de estudiar la diferenciación celular, que es el proceso mediante el cual las células embrionarias no diferenciadas se convierten en células de tipo altamente especializado, y el hecho de que las células cultivadas respondan al tratamiento con fármacos, hormonas, factores de crecimiento y otras sustancias activas.

Según se describe en la página 378, el primer intento de cultivar células vivientes de vertebrados fuera del cuerpo se realizó con éxito en 1907. En los siguientes decenios, varios investigadores afinaron las condiciones óptimas para desarrollar células animales fuera del cuerpo y

conservar los cultivos libres de contaminación con microorganismos. En los primeros estudios de cultivos de tejido se emplearon medios que contenían una gran variedad de sustancias desconocidas. El crecimiento de las células se logró añadiendo líquidos obtenidos de sistemas vivientes, como linfa, suero sanguíneo u homogenado de embriones. Se observó que las células requieren gran variedad de nutrientes, hormonas, factores de crecimiento y cofactores para permanecer saludables y creciendo. Incluso en la actualidad, la mayor parte de los medios de cultivo contienen una cantidad considerable de suero.

La principal meta del cultivo de células es desarrollar medios definidos libres de suero que apoyen el crecimiento de las células. Utilizando un método pragmático en el cual se combinaron varios ingredientes para probar su capacidad de apoyo al crecimiento y proliferación celular, se cultivó con éxito un número cada vez mayor de tipos celulares en medios completamente "artificiales" que carecen de suero o de otros líquidos naturales. Como sería de esperar, la composición de estos medios químicamente definidos es relativamente compleja y consta de una mezcla de nutrientes y vitaminas, junto con varias proteínas purificadas, incluyendo insulina, factor de crecimiento epidérmico y transferrina (que suministra a las células hierro aprovechable). En el cuadro 17-2 se proporciona una lista de los suplementos empleados con mayor frecuencia en medios libres de suero. Además de un medio complejo, casi todas las células requieren una superficie apropiada sobre la cual crecer. A diferencia de la mayor parte de las células cancerosas, capaces de crecer en suspensión, las células normales requieren un sustrato sólido, como vidrio o plástico. Una vez asentadas las células en el fondo del plato de cultivo, secretan materiales extracelulares como colágeno, fibronectina y laminina, que las ayudan a conservarse fijas al sustrato.

El primer paso para el cultivo es obtener las células. En la mayor parte de los casos sólo es necesario extraer de un tanque de nitrógeno líquido un frasco de células previamente cultivadas y congeladas, derretir el contenido del frasco y transferir las células al medio que espera por ellas. Un cultivo de este tipo se conoce como **cultivo secundario**, porque las células se derivan de un cultivo previo. Por otra parte, en un **cultivo primario** las células se obtienen a partir del propio organismo. Los cultivos primarios de células animales se obtienen en su mayor parte de embriones cuyos tejidos son más fáciles de disociar en células aisladas comparados con tejidos adultos. La disociación se efectúa quitando el tejido del embrión y de ordinario se trata con una enzima proteolítica, como tripsina, capaz de digerir el material proteináceo que mantiene juntas a las células. A continuación se lava el tejido para liberarlo de la enzima y por lo general se suspende en una solución salina sin iones Ca^{2+} pero con una sustancia, como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), que enlaza iones calcio (quelatos). Como se estudió en el capítulo 7, los iones calcio desempeñan un papel clave en la adherencia célula-célula, y su eliminación de los tejidos facilita mucho la separación de las células.

Una vez disociadas las células en suspensión de células aisladas, se pueden cultivar directamente o ser separadas según su propio tipo, y a continuación colocarlas en cultivo.

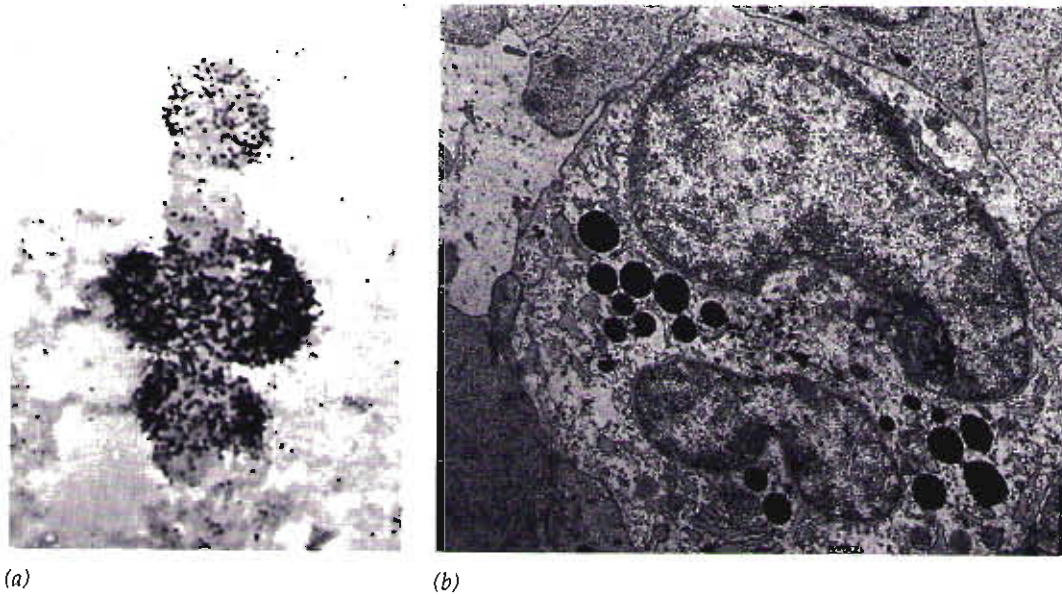


FIGURA 17-20. Ejemplos de autorradiografía con microscopio de luz y con microscopio electrónico. *a)* Autorradiografía con microscopio de luz de un cromosoma politeno del insecto *Chironomus*, mostrando la extensa incorporación de ^3H -uridina en el RNA de las regiones esponjadas del cromosoma. Las autorradiografías de este tipo confirman que los cromosomas esponjados son sitios de transcripción. Esta micrografía se puede comparar con la de la figura 10-7, *b*, que muestra el mismo cromosoma observado con el microscopio electrónico tridimensional. *b)* Autorradiografía con microscopio electrónico de una célula de médula ósea incubada en $^{35}\text{SO}_4$ durante cinco minutos y fijada de inmediato. La incorporación de sulfato, según se revela por los granos plateados de color oscuro, se localiza principalmente en el complejo de Golgi (flecha). (*a*: Según C. Pelling, *Chromosoma* 15:98, 1964; *b*: según R.W. Young, *J. Cell Biol.* 67:177, 1973; con permiso de Rockefeller University Press.)

Las células se pueden separar mediante algunas técnicas, como centrifugación diferencial o el uso de un *clasificador celular fluorescente activado*. En esta última técnica, la suspensión de células se trata con un anticuerpo fluorescente que se enlaza específicamente a la superficie del tipo de célula que se intenta cultivar y luego se pasa la suspensión a través de un instrumento electrónico capaz de apartar en un tubo separado células marcadas con fluorescencia de aquellas que carecen de marca.

Una vez separadas las células se pueden iniciar dos tipos básicos de cultivo primario. En un **cultivo de masa** se añade un gran número de células al plato de cultivo, que se asientan y fijan al fondo del plato y forman una capa relativamente uniforme de células. Las células que sobreviven crecen y se dividen, y luego de algunas generaciones forman una monocapa de células que cubre el fondo del plato (fig. 17-21, *a*). En el otro tipo de cultivo, llamado **cultivo clonal**, se añade una cantidad relativamente pequeña de células a un plato de cultivo; después de asentarse y fijarse a la superficie del fondo, cada una se encuentra a cierta distancia de sus vecinas; en este caso, la proliferación de las células genera colonias individuales o *clonos* de células (fig. 17-21, *b*) cuyos miembros se derivan de la misma célula original.

Las células normales (no malignas) sólo pueden efectuar un número limitado de divisiones celulares (típicamente 50 a 100) antes de sufrir un proceso de senectud y muerte. Debido a esto, muchas de las células comúnmente utilizadas en estudios de cultivo de tejidos han sufrido modificaciones genéticas que les permiten crecer de manera indefinida. Las células de este tipo se conocen como *estirpe celular*, y en

condiciones típicas pueden crecer para formar tumores malignos cuando se inyectan a un animal de laboratorio susceptible. La frecuencia de transformación espontánea de una célula normal que crece en cultivo a una estirpe celular, se relaciona con la especie de la cual se deriva. Por ejemplo, las células de ratón a menudo se transforman de esta manera; las células humanas sólo lo hacen raras veces.

Muchos tipos diferentes de células vegetales también pueden crecer en cultivo de células. El primer paso en la formación de estos cultivos es tratar las células con la enzima celulasa capaz de digerir la pared que rodea la célula, y liberar la célula desnuda o **protoplasto**. Los protoplastos pueden entonces crecer en un medio químicamente definido que promueve su desarrollo y división. En condiciones adecuadas, las células pueden crecer formando grumos de células indiferenciadas llamados *callos*, en los cuales se puede inducir el desarrollo de retoños para regenerar nuevas plantas.

17-6 Fraccionamiento del contenido de una célula por centrifugación diferencial

La mayor parte de las células contienen gran variedad de diferentes tipos de organelos. Cuando se pretende estudiar una función particular de las mitocondrias o aislar una enzima particular del complejo de Golgi, es de suma utilidad poder aislar el organelo relevante en estado puro. El aislamiento de un organelo particular en cantidad apreciable

CUADRO 17-2. Suplementos de un medio libre de suero

	Concentración
Hormonas y factores de crecimiento	
Insulina	0.1-10 g/ml
Glucagon	0.05-5 g/ml
Factor de crecimiento epidérmico	1-100 ng/ml
Factores de crecimiento nervioso	1-10 ng/ml
Factor Gimmel	0.5-10 g/ml*
Factor de crecimiento de fibroblastos	1-100 ng/ml
Hormona foliculoestimulante	50-500 ng/ml
Hormona de crecimiento	50-500 ng/ml
Hormona luteinizante†	0.5-2 g/ml
Hormona liberadora de tiotropina	1-10 ng/ml
Hormona liberadora de hormona luteinizante	1-10 ng/ml
Prostaglandina E ₁	1-100 ng/ml
Prostaglandina F ₂	1-100 ng/ml
Triyodotironina	1-100 pM
Hormona paratiroidea	1 ng/ml
Somatomedina C	1 ng/ml
Hidrocortisona	10-100 nM
Progesterona	1-100 nM
Estradiol	1-10 nM
Testosterona	1-10 nM
Proteínas de enlace	
Transferrina	0.5-100 g/ml
BSA libre de ácido graso‡	1 mg/ml
Factor de fijación y dispersión	
Globulina insoluble al frío	2-10 g/ml
Factor sérico de propagación	0.5-5 g/ml
Fetuina†	0.5 mg/ml
Gel de colágena	Cubierta de sustrato
Recubrimiento de polilisina	Cubierta de sustrato
Factores nutrientes de bajo peso molecular	
H ₂ SeO ₃	10-100 nM
CdSO ₄	0.5 μM
Putrescina	100 μM
Acido ascórbico	10 μg/ml
α-Tocoferol	10 μg/ml
Retinol	10 ng/ml
Acido linoleico§	3-5 μg/ml

* La concentración depende de la pureza de la preparación.

† La actividad promotora de crecimiento se debe a impurezas.

‡ No estimulante a menos que se añada con un ácido graso *cis*-insaturado.

§ No estimulante a menos que se añada con BSA.

FUENTE: D. Barnes y G. Sato, *Anal. Biochem.* 102:258, 1980.

por lo general se logra mediante la técnica de **centrifugación diferencial**, que depende del principio siguiente: si se colocan partículas materiales más densas que el medio que las rodea en un campo de centrifugación, las de diferente tamaño y forma viajan hacia el fondo del tubo de la centrífuga a diferente velocidad.

Primero las células se rompen mediante alguna técnica, casi siempre agitación mecánica en solución isotónica amortiguada (con frecuencia contiene sacarosa) utilizando un *homogeneizador* mecánico. A continuación se somete el homogenizado a una serie de centrifugaciones secuenciales (fig. 17-22, a). Al principio, el homogenizado se somete a fuerzas centrífugas de baja intensidad durante un breve periodo, de modo que sólo los organelos celulares de mayor tamaño, los núcleos (y algunas células residuales completas) se sedimenten para formar un pellet. Con fuerza centrífuga

sucesivamente mayor se pueden aislar de la suspensión los organelos citoplásmicos más grandes (mitocondrias, cloroplastos, lisosomas y peroxisomas), a continuación se separan los microsomas (fragmentos de membranas vacuolares y reticulares del citoplasma) y por último los ribosomas. Este último paso requiere una ultracentrífuga capaz de generar velocidades de 75 000 revoluciones por minuto, produciendo fuerzas equivalentes a 500 000 veces la gravedad.

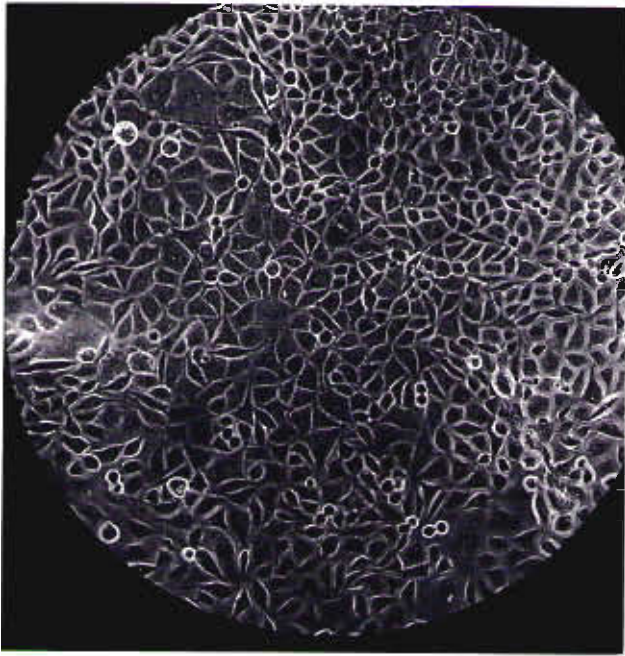
Una vez extraídos los ribosomas, el sobrenadante contiene la fase soluble de la célula y las partículas demasiado pequeñas para quitar con facilidad mediante sedimentación. Los pasos iniciales de la centrifugación diferencial por lo general no separan fracciones puras de un organelo particular, por lo que de ordinario se requieren pasos adicionales. En muchos casos se logra mayor purificación centrifugando la preparación cruda a través de un gradiente de densidad de sacarosa, como se muestra en la figura 17-22, b. La centrifugación a través de un gradiente distribuye el contenido de la fracción en varias capas, según la densidad de los componentes (estudiado con mayor detalle en el tema de centrifugación de equilibrio en un gradiente de densidad, en la página 730).

Los organelos celulares aislados mediante centrifugación diferencial retienen sus actividades normales un nivel notablemente elevado, siempre y cuando no se expongan a condiciones desnaturalizantes durante el aislamiento. Se pueden usar organelos aislados con este procedimiento en *sistemas libres de células* para estudiar una gran variedad de actividades que ocurren dentro de la célula viviente, incluyendo síntesis de proteínas enlazadas a las membranas, transporte de solutos y desarrollo de gradientes iónicos, y fosforilación oxidativa.

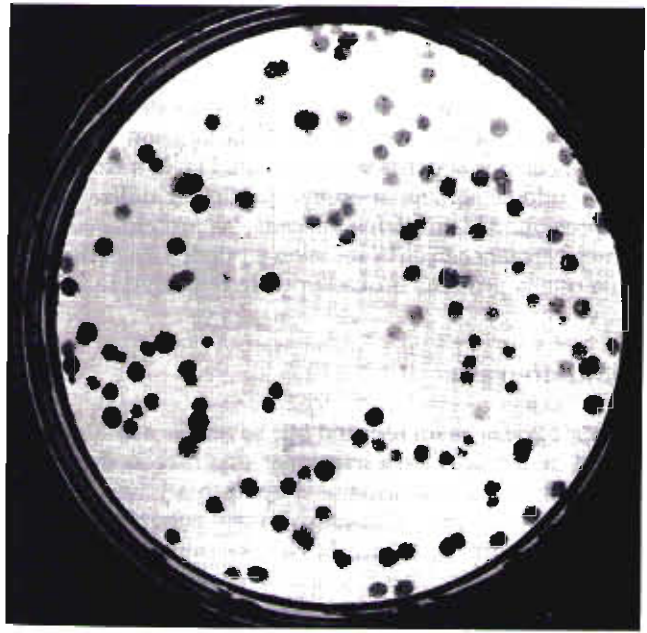
17-7 Aislamiento, purificación y fraccionamiento de proteínas

A todo lo largo de este libro hemos considerado las propiedades de una u otra proteína. Para obtener información acerca de la estructura o función de una proteína particular es necesario aislarla y purificarla antes de análisis adicionales. Puesto que la mayor parte de las células contienen miles de proteínas diferentes, la purificación de una sola especie, en particular si está presente en un componente relativamente menor, puede ser una meta desafiante. El propósito de esta sección es analizar brevemente las técnicas más relevantes en estudios de proteínas efectuados por biólogos celulares y moleculares.

Para el propósito presente se pueden dividir los métodos de purificación de proteínas en dos amplias categorías: *preparatorios* y *analíticos*. Las técnicas preparatorias se emplean para aislar y purificar una proteína particular eliminando moléculas contaminantes. El término *preparatorio* implica que después de aislado el material será usado para otros estudios. Los procedimientos analíticos permiten estimar la diversidad de moléculas presentes en una preparación determinada y definir las propiedades de especies individuales de moléculas. El término *analítico* implica desarmar el todo para examinar sus partes. Por ejemplo, si se desea determinar el número de diferentes tipos de macro-



(a)



(b)

FIGURA 17-21. Dos tipos de cultivo de células. a) Micrografía del luz que muestra una pequeña porción de una masa de cultivo de células L de ratón desarrollándose sobre la superficie de un plato de cultivo en un medio químicamente definido. b) Micrografía con bajo poder de amplificación de colonias dispersas sobre la superficie de un plato de cultivo. En este cultivo clonal, cada colonia contiene células descendientes de una célula original única. Este cultivo se inició añadiendo sólo unas 100 células al plato. (Cortesía de Charity Waymouth.)

moléculas presentes en ribosomas bacterianos y sus diferentes pesos moleculares, el primer paso sería preparatorio para obtener una muestra purificada de ribosomas a partir de la cual se puedan obtener los componentes solubles. Los pasos subsiguientes requieren separar los componentes de alguna manera para investigar su diversidad y peso molecular. En los procedimientos analíticos es necesario **fraccionar** la mezcla en sus ingredientes elementales. En muchos casos, ambas metas se logran con el mismo tipo de técnicas, puesto que el fraccionamiento de una mezcla simultáneamente logra la purificación de cada sustancia.

La purificación de una proteína por lo general se lleva a cabo eliminando gradualmente los contaminantes. Dos proteínas pueden compartir una propiedad similar, como carga eléctrica total, aunque pueden ser muy diferentes respecto de otra propiedad, como peso molecular. Por consiguiente, la purificación completa de una proteína determinada de ordinario requiere el uso de técnicas sucesivas que aprovechan las propiedades diferentes de las proteínas que deben aislarse.

La purificación se cuantifica como incremento de la **actividad específica**, que es la relación entre la cantidad de dicha proteína y la cantidad total de la proteína presente en la muestra. Se debe utilizar alguna característica identificable de la proteína específica para diseñar un **ensayo** capaz de determinar la cantidad relativa de dicha proteína en la muestra. Si la proteína es una enzima, se puede ensayar su actividad catalítica para medir la purificación. Alternativamente, los ensayos pueden basarse en criterios inmunológi-

cos, electroforéticos, de microscopía electrónica y otros. La cuantificación de proteína total en una muestra se puede efectuar de varias maneras, incluyendo nitrógeno total, que puede medirse con gran precisión y es muy constante casi a 16% del peso seco de toda proteína.

Precipitación selectiva

El primer paso en la purificación debe poder efectuarse en preparaciones muy impuras y lograr un gran incremento de la actividad específica. Este primer paso de ordinario aprovecha diferencias de solubilidad entre proteínas para precipitar selectivamente la proteína deseada. La solubilidad de una proteína depende del equilibrio relativo entre las interacciones proteína-solvente que tienden a conservarla en solución, y las interacciones proteína-proteína que tienden a causar la formación de agregados y precipitación. La fuerza iónica de la solución es particularmente importante para determinar cuál de estos tipos de interacción predomina. Con fuerza iónica de poca intensidad las interacciones con el solvente se incrementan y las proteínas tienden a permanecer en solución; se dice que son proteínas disueltas *en sal*. Sin embargo, cuando la intensidad iónica se eleva, la solubilidad de la proteína puede disminuir con rapidez. La sal empleada con mayor frecuencia para la precipitación selectiva de proteínas es el sulfato de amonio, altamente soluble en agua y de fuerza iónica elevada. La purificación se logra añadiendo gradualmente solución sa-

turada de sulfato de amonio al extracto crudo de la proteína. Conforme se adiciona la sal, las proteínas contaminantes precipitan cada vez en mayor cantidad y el precipitado puede descartarse. Por último, se alcanza un punto en el cual la proteína bajo estudio sale de la solución. Este punto se reconoce por la pérdida de actividad en la fracción soluble cuando se somete al ensayo particular utilizado. Una vez precipitada la proteína buscada, las proteínas contaminantes permanecen en la solución y pueden descartarse, en tanto que la proteína buscada puede redisolverse.

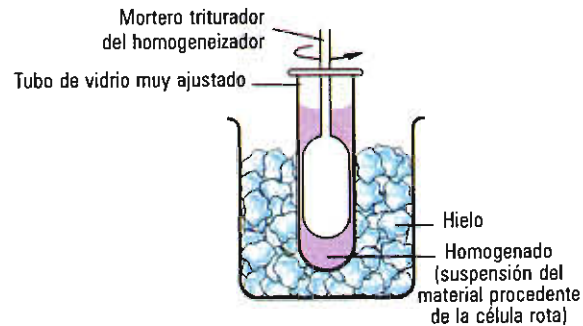
Cromatografía

Cromatografía es un término que se refiere a una gran variedad de técnicas para fraccionar una mezcla de componentes disueltos conforme se desplazan a través de algún tipo de matriz porosa. Una técnica cromatográfica ofrece a los componentes de la mezcla dos fases alternativas con las cuales pueden asociarse: una fase móvil que contiene el solvente que se desplaza y una fase inmóvil que consta de la matriz a través de la cual se desplaza el solvente. En los procedimientos cromatográficos descritos más adelante, la fase inmóvil consta de materiales empacados en una columna. Las proteínas que deben fraccionarse se disuelven en el solvente y luego pasan a través de la columna. Los materiales que constituyen la fase inmóvil contienen sitios a los cuales se pueden unir las proteínas disueltas. Conforme las moléculas individuales interactúan con los materiales de la matriz, su avance a través de la columna se retrasa. Por lo tanto, cuanto mayor sea la afinidad de una molécula particular por el material de la matriz, más lento será su paso a través de la columna. Puesto que los diferentes componentes de la mezcla poseen distinta afinidad por la matriz, serán retardados diferencialmente. A medida que el solvente pasa por la columna y se desliza hacia el fondo se puede recolectar como *fracciones* en una serie de tubos. Los componentes de la mezcla con menor afinidad por la columna aparecen en las primeras fracciones que emergen de dicha columna. En años recientes mejoró la resolución de muchos procedimientos cromatográficos con el desarrollo de la **cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR)**, en la cual se emplean columnas largas y estrechas y la fase móvil pasa bajo presión elevada a través de una matriz firmemente empacada.

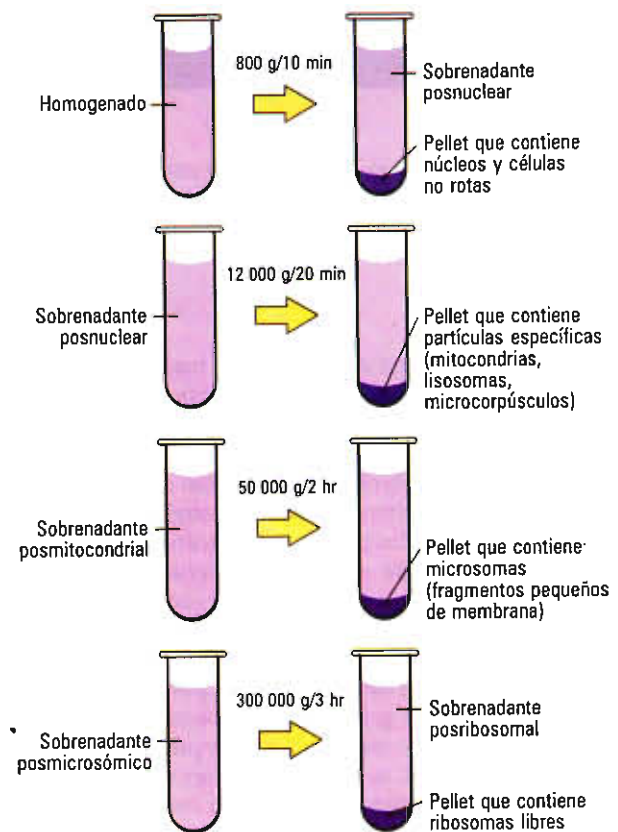
Cromatografía por intercambio de iones

Las proteínas son grandes electrólitos polivalentes y es improbable que muchas proteínas en una preparación parcialmente purificada tengan la misma carga total. En varias técnicas se emplea la carga iónica como base de purifica-

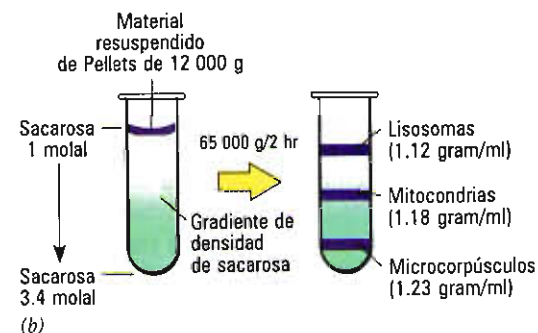
Quitar el tejido
Rebanar con hoja filosa en pedazos pequeños
Suspender en medio de homogeneización isotónico frío (p. ej., sacarosa 0.25M)
Homogeneizar el fragmento de tejido



Componente subcelular aislado del homogenado mediante centrifugación diferencial



(a)



(b)

FIGURA 17-22. Fraccionamiento celular. a) Procedimiento paso a paso para la purificación de organelos mediante centrifugación diferencial. b) Pasos subsiguientes de purificación mediante centrifugación con equilibrio en un gradiente de densidad. En este último tipo de centrifugación, el medio se compone de un gradiente de densidad y las partículas sedimentan hasta que alcanzan un sitio en el tubo igual a su propia densidad, sitio en donde forman bandas.

ción (o fraccionamiento analítico), incluyendo la **cromatografía por intercambio de iones**. La carga total de una proteína es la suma de todas las cargas individuales de sus aminoácidos componentes. Puesto que la carga de cada aminoácido depende del pH del medio (fig. 2-27), la carga de cada proteína también depende del pH. Conforme el pH desciende, los grupos con carga negativa se neutralizan y aumenta el número de grupos con carga positiva. Incrementando el pH se puede obtener un resultado opuesto. Existe un pH para cada proteína donde el número de cargas negativas es igual al número de cargas positivas. Este pH es el **punto isoeléctrico**, en el cual la proteína es neutra. El punto isoeléctrico de la mayor parte de las proteínas es menor de pH 7.

La cromatografía por intercambio iónico depende de la asociación iónica entre proteínas y grupos con carga enlazados a un material inerte de sostén, como la celulosa. Las dos resinas de intercambio iónico empleadas con mayor frecuencia son dietilaminoetil (DEAE)-celulosa y carboximetil (CM)-celulosa. La DEAE-celulosa posee carga positiva y por lo tanto actúa enlazándose a moléculas con carga negativa; es un *intercambiador aniónico*. La CM-celulosa posee carga negativa y actúa como *intercambiador catiónico*. La resina se encuentra empacada en una columna y la solución de proteínas se desliza a través de la columna en un amortiguador cuya composición favorece el enlace de algunas o todas las proteínas a la resina. Las proteínas enlazadas a la resina pueden desplazarse a continuación incrementando la fuerza iónica del amortiguador (que añade iones pequeños para competir con los grupos cargados de las macromoléculas por los sitios sobre la resina), cambiando el pH, o ambas cosas. El desplazamiento de las proteínas enlazadas se puede efectuar de manera gradual añadiendo en secuencia una serie de diferentes amortiguadores o de manera continua añadiendo una solución de fuerza iónica o pH (un gradiente) continuamente variable. La figura 17-23 muestra una representación esquemática de la separación de dos especies de proteínas mediante elusión gradual en una columna de intercambio iónico.

Cromatografía por filtración en gel

La **filtración en gel** puede separar proteínas (o ácidos nucleicos) principalmente por su peso molecular. Igual que en la cromatografía por intercambio iónico, el material de separación consta de minúsculas esferitas empacadas en una columna a través de la cual pasan lentamente las proteínas en solución. Las esferitas empleadas en la filtración en gel se componen de polisacáridos con enlaces transversos (dextranos o agarosas) de porosidad diferente. La técnica se ilustra mejor mediante un ejemplo (fig. 17-24).

Consideremos que la proteína que debe purificarse tiene un peso molecular de 125 000 daltons y se encuentra en solución con dos proteínas contaminantes de 250 000 daltons y 75 000 daltons. Una manera de purificar la proteína buscada es pasar la mezcla a través de una columna de Sephadex G150, que consta de esferillas que sólo permiten el paso a su interior de moléculas menores de 200 kD. Cuando la solución que contiene estas proteínas pasa por el lecho de la columna, la proteína de 250 kD no puede penetrar a las esferillas y, por lo tanto, permanece disuelta en la fase mó-

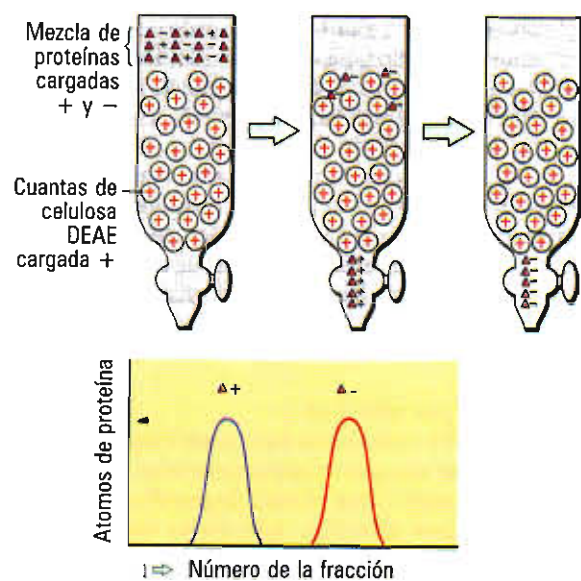


FIGURA 17-23. Cromatografía por intercambio iónico. Separación de dos especies de proteína mediante DEAE-celulosa. En este caso se emplea una resina de intercambio iónico con carga positiva para enlazar proteínas cargadas más negativamente.

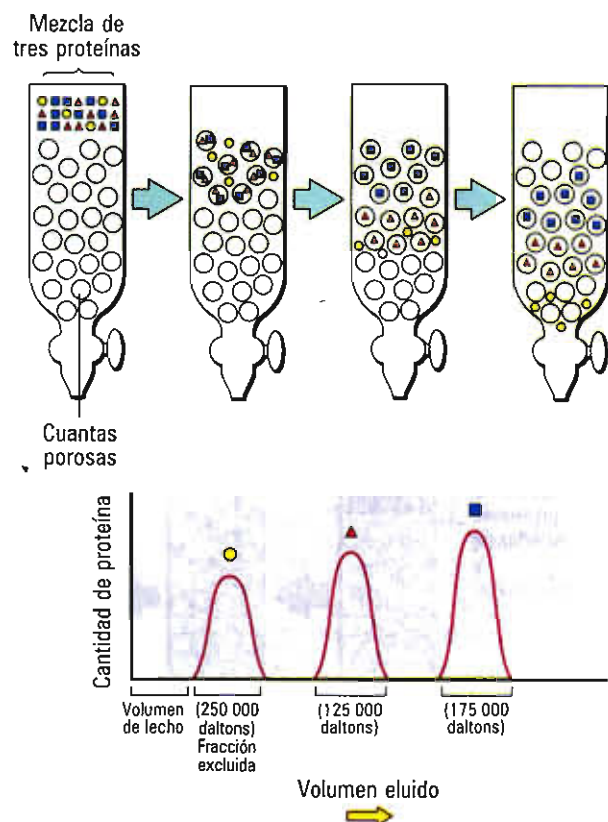


FIGURA 17-24. Cromatografía por filtración en gel. Separación de tres proteínas dependiendo de su peso molecular, según se describe en el texto.

vil del solvente y será eludida tan pronto como el solvente preexistente en la columna (volumen del lecho) se deslice. En contraste, las otras dos proteínas pueden difundir hacia los intersticios entre las esferillas y retardan su paso a través de la columna. A medida que se desplaza más y más solvente a través de la columna estas proteínas continúan su trayecto y salen por el fondo, pero a diferente velocidad. Para proteínas capaces de penetrar a las esferillas, las especies más pequeñas se retardan en mayor extensión comparadas con las más grandes. Por consiguiente, la proteína de 125 kD será eludida en estado purificado, en tanto que la proteína de 75 kD permanece en la columna.

Cromatografía por afinidad

En las técnicas descritas hasta aquí se utilizan las propiedades de la masa de una proteína para efectuar la purificación o el fraccionamiento. Otra técnica de purificación, llamada **cromatografía por afinidad**, aprovecha las propiedades estructurales únicas de una proteína que permiten eliminar la molécula específicamente de la solución en tanto que las otras permanecen disueltas (fig. 17-25). Las proteínas interactúan con compuestos específicos: enzimas con sustratos, receptores con ligandos, anticuerpos con antígenos, y así sucesivamente. Cada uno de estos tipos de proteínas se puede eliminar de la solución pasando la mezcla de proteínas por una columna donde la molécula interactuante específica (sustrato, ligando, antígeno, etc.) se encuentra inmovilizada por unión a un material inerte (la matriz). Por ejemplo, si se pasa una preparación impura de receptores de

insulina a través de una columna con esferillas de agarosa unidas a la proteína insulina, el receptor se enlazará específicamente a las esferillas en tanto las condiciones dentro de la columna sean adecuadas para promover esta interacción. Una vez que todas las proteínas contaminantes pasan a través de la columna y salen por el extremo inferior, las moléculas del receptor de insulina se pueden desplazar de la matriz cambiando la composición iónica del solvente dentro de la columna. Por lo tanto, a diferencia de los otros procedimientos cromatográficos que separan proteínas con base en el tamaño o la carga eléctrica, la cromatografía por afinidad puede eliminar de una muestra compleja de proteínas una proteína específica, y con frecuencia la purificación lograda de la molécula deseada es casi total en un solo paso.

En *La vía experimental* de los capítulos 4 y 15 se ilustra el empleo de estos diferentes procedimientos cromatográficos.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Otra técnica especialmente poderosa y muy utilizada para fraccionar proteínas es la **electroforesis**. Hay gran variedad de técnicas para electroforesis, y todas dependen de la capacidad de moléculas con carga para desplazarse cuando se colocan en un campo eléctrico. La separación de proteínas por electroforesis de ordinario se logra mediante **electroforesis en gel de poliacrilamida (EGPA)**, en la cual las proteínas se mueven por acción de una corriente eléctrica aplicada a través de un gel compuesto de una pequeña molécula orgánica (acrilamida) unida mediante enlaces transversos para formar una criba molecular. El gel puede formarse como una delgada capa entre dos placas de vidrio o como un cilindro dentro de un tubo de cristal. Una vez polimerizado el gel, la placa (o tubo) se suspende entre dos compartimientos que contienen amortiguador dentro del cual se sumergen electrodos con carga opuesta. La muestra que contiene las proteínas concentradas se extiende en una placa de gel en surcos situados a lo largo de la parte superior del gel, según se muestra en la figura 17-26. La muestra de proteínas se prepara en solución de sacarosa o glicerol cuya densidad evita que la muestra se mezcle con el amortiguador en el compartimiento superior. Se aplica entonces un voltaje entre los compartimientos de amortiguador y la corriente fluye a través de la placa causando que las proteínas se desplacen hacia electrodos con carga opuesta. Típicamente, la separación se efectúa utilizando amortiguadores alcalinos que confieren carga eléctrica negativa a las proteínas y las obligan a desplazarse hacia el ánodo con carga positiva en el extremo opuesto del gel (fig. 17-26).

El movimiento relativo de proteínas a través de un gel de poliacrilamida depende del tamaño, forma y densidad de carga (carga por unidad de masa) de las moléculas. Cuanto mayor la densidad de carga, la proteína avanza con mayor fuerza a través del gel y por lo tanto su velocidad de migración es más rápida. Sin embargo, puesto que la poliacrilamida forma una criba molecular con enlaces transversos, cuanto mayor sea la proteína más se enredará conforme avanza y por lo tanto menor será su velocidad de

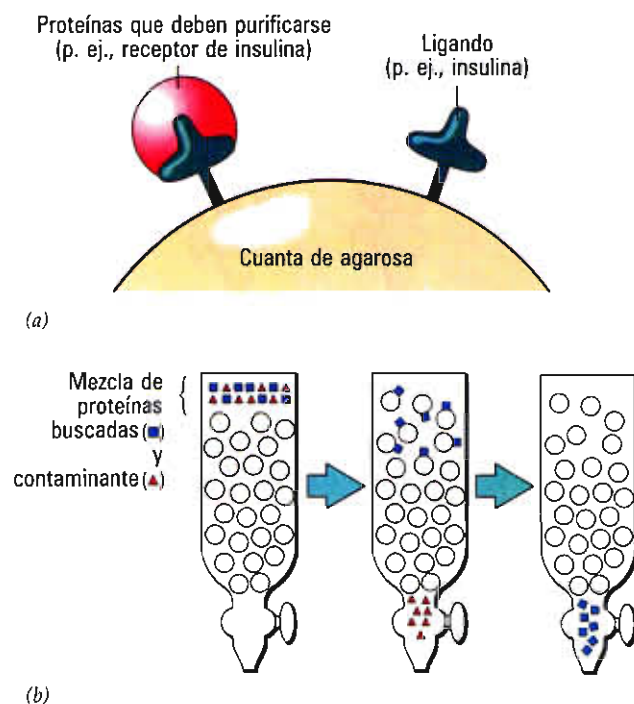


FIGURA 17-25. Cromatografía por afinidad. a) Representación esquemática de cuantas recubiertas de agarosa con las cuales sólo se pueden combinar proteínas específicas. b) Pasos en el procedimiento cromatográfico.

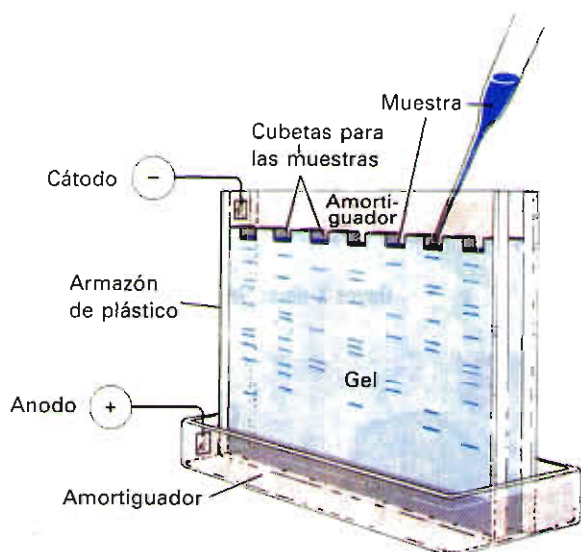


FIGURA 17-26. Electroforesis en gel de poliacrilamida. Las muestras de proteína de ordinario se disuelven en una solución de sacarosa cuya densidad evita que la muestra se mezcle con el amortiguador y luego se carga en cubetas con una fina pipeta, según se muestra en la figura. Se aplica una corriente directa a través del gel, que produce desplazamiento de las proteínas dentro de la poliacrilamida a lo largo de líneas paralelas. Cuando se efectúa en el detergente DSS, que por lo general este es el caso, las proteínas se mueven como bandas a velocidades inversamente proporcionales a su peso molecular. Las bandas que aquí se muestran con propósitos de ilustración de ordinario no serían visibles sino hasta después de la electroforesis y luego de eliminar el gel del marco y teñir en una bandeja.

movimiento. La capacidad de una proteína de determinado tamaño para desplazarse a través del gel depende de la concentración de la poliacrilamida empleada para constituir la criba. Cuanto menor sea la concentración (hasta un mínimo cercano a 2%) de acrilamida, menor será el número de enlaces cruzados y determinada molécula de proteína se desplazará con mayor rapidez. La forma también es un factor, puesto que proteínas globulares compactas se mueven con mayor rapidez en comparación con proteínas fibrosas, alargadas, de peso molecular comparable.

El avance de la electroforesis se puede seguir si se observa el desplazamiento de la *huella de un colorante* con carga eléctrica que se mueve justo adelante de las proteínas más rápidas. Luego de cierto tiempo se interrumpe la corriente y se elimina el gel del contenedor. El gel se puede teñir para investigar la localización de las proteínas. Si las proteínas están marcadas con isótopo radiactivo se puede determinar su sitio presionando el gel contra un fragmento de película radiográfica para producir una autorradiografía. Alternativamente, se puede seccionar el gel en porciones y aislar las proteínas individuales, o también presionar el gel contra un pedazo de papel filtro de nitrocelulosa y someter a tratamiento adicional de electroforesis para desplazar las proteínas fuera del gel y absorberlas sobre la superficie de la nitrocelulosa. Este último procedimiento, llamado *mancha Western*, se puede emplear para identificar

bandas individuales de proteínas por su interacción con anticuerpos específicos.

EGPA-DSS

De ordinario, EGPA se realiza en presencia del detergente dodecilsulfato sódico, que posee carga negativa y se enlaza en gran cantidad a todo tipo de moléculas de proteína. La repulsión electrostática entre las moléculas DSS enlazadas causa que las proteínas se desdoblén en barras cilíndricas semejantes, eliminando así la diferencia de forma como factor que impida la separación. El número de moléculas DSS enlazadas a la proteína regularmente es proporcional al peso molecular de la misma. Por consiguiente, una especie de proteína, cualquiera que sea su tamaño, siempre tiene la misma densidad de carga y será impulsada a través del gel con la misma fuerza. Sin embargo, puesto que la poliacrilamida presenta abundantes enlaces transversales, retiene las proteínas de mayor tamaño en mayor extensión comparadas con las proteínas más pequeñas. Como resultado, las proteínas se separan según una sola propiedad: su peso molecular. Además de separar las proteínas de una mezcla, la EGPA-DSS se puede emplear para determinar el peso molecular de diferentes proteínas comparando la posición de las bandas contra las producidas por proteínas de tamaño conocido. En las páginas 163 y 316 se muestran ejemplos de EGPA-DSS.

Técnica del punto isoeléctrico

La *técnica del punto isoeléctrico* es un tipo de electroforesis efectuada en un gel que contiene una mezcla de *anfolitos*, polímeros de bajo peso molecular con proporción variable de grupos amino cargados positivamente y grupos carboxilo cargados negativamente. Cuando se aplica un voltaje a través de este gel, las moléculas de anfolitos se redistribuyen y las más negativas se aproximan al ánodo en tanto que las más positivas se desplazan al cátodo. Este movimiento establece un gradiente estable de pH de un extremo al otro del gel. Conforme las proteínas se mueven a través del gel en respuesta al campo eléctrico, se exponen a un pH que cambia continuamente, generando un cambio continuo en su carga iónica. En algún punto a lo largo del gel cada proteína encuentra un pH igual a su punto isoeléctrico donde la proteína se convierte en una molécula neutra y detiene su desplazamiento. Como resultado, cada especie de proteína se localiza a lo largo del gel en una banda muy precisa, en posición muy predecible.

Electroforesis bidimensional en gel

En 1975 se desarrolló una nueva técnica bidimensional para separar proteínas basada en diferentes propiedades de las moléculas. Primero se separan las proteínas según su punto isoeléctrico dentro de un gel tubular. Después de la separación, se elimina el gel y se coloca sobre una placa de poliacrilamida saturada de dodecilsulfato de sodio y se somete a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio. Las proteínas se mueven en el gel de la placa y se separan según su peso molecular (fig. 17-27). La resolución de esta técnica es tan grande que prácticamente se pueden distinguir todas las proteínas presentes en cantidades de-

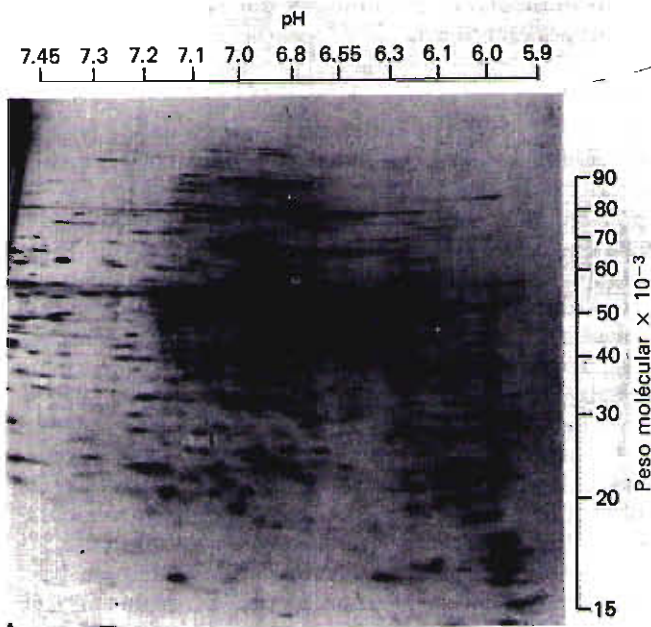


FIGURA 17-27. Electroforesis bidimensional en gel. Gel bidimensional de poliacrilamida de proteínas cromosómicas no de histona de células HeLa marcadas con ^{35}S -metionina. (Según J.L. Peterson y E.H. McConkey, J. Biol. Chem. 251:550, 1976.)

tectables dentro de una célula. Mediante este procedimiento se pueden aislar más de 1 000 proteínas diferentes.

17-8 Determinación de la estructura de una proteína mediante análisis de difracción de rayos X

El primer paso para analizar una proteína particular por cualquier técnica es obtener una preparación de la misma en la forma más pura posible. En la **difracción de rayos X** (o **cristalografía de rayos X**) se emplean cristales de proteínas, preparación que garantiza la mejor pureza molecular. Un cristal consta de una disposición regularmente repetida de una unidad celular, en este caso una molécula individual de proteína. Para el análisis de difracción de rayos X se bombardea un cristal con un delgado haz de rayos X de una sola longitud de onda (monocromático) (fig. 17-28, a,b). La radiación dispersada (difracción) por los electrones de los átomos de la proteína incide sobre una placa fotográfica colocada detrás del cristal. Igual que la molécula de proteína se repite de manera periódica dentro del cristal, así también cada átomo dentro de la molécula. El patrón de difracción producido por un cristal es determinado por la estructura interna de la proteína; el gran número de moléculas dentro del cristal incrementa el número de reflexiones y el cristal se comporta como una molécula gigante.

La posición e intensidad de los puntos sobre la placa se puede relacionar matemáticamente con la densidad de electrones dentro de las proteínas, puesto que los electrones de

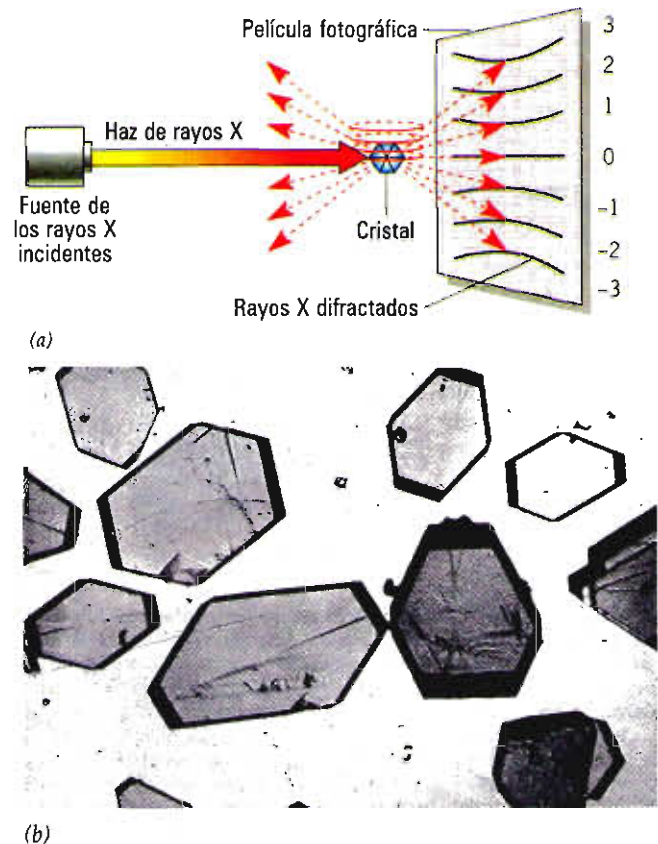


FIGURA 17-28 Análisis por difracción de rayos X. a) Diagrama de la difracción de rayos X por los átomos de un plano de un cristal sobre una placa fotográfica. La disposición ordenada de los átomos dentro del cristal produce una serie repetitiva de ondas circulares superpuestas que se propagan e intersectan la placa de película. Igual que con la difracción de luz visible, las ondas forman un patrón de interferencia reforzándose entre sí en algunos puntos sobre la película y cancelándose en otros puntos. b) Cristales de mioglobina como los utilizados para el análisis por difracción de rayos X. (b: Cortesía de John Kendrew.)

los átomos producen dichos puntos. Debido a la manera de bombardear el cristal, cada placa representa una rebanada de la molécula y se deben analizar muchas placas antes de obtener el patrón total de difracción. En la figura 2-34 se muestra una sola placa fotográfica empleada para determinar la estructura tridimensional de la mioglobina. Los puntos más próximos al centro del patrón se deben a la dispersión de los rayos X con ángulos de menor abertura a partir del cristal y suministran información acerca de los aspectos más burdos de la proteína, o sea, los espacios más grandes dentro de la molécula. Los puntos más próximos a la periferia de la fotografía contienen información de los lados de las moléculas más próximos en el espacio dentro del cristal. La resolución obtenida mediante difracción de rayos X depende del número de puntos analizados.

La mioglobina fue la primera proteína cuya estructura se determinó mediante difracción de rayos X. Esta proteína se analizó sucesivamente a 6, 2 y 1.4 Å, y transcurrieron varios años antes de concluir cada determinación. Conside-

rando que las uniones covalentes se encuentran entre 1 y 1.5 Å de longitud y las uniones no covalentes entre 2.8 y 4 Å de longitud, la descripción obtenida de la proteína depende en gran medida de la resolución. Esto se ilustra comparando la densidad de electrones de una pequeña molécula orgánica en cuatro niveles de resolución (fig. 17-29). En la mioglobina es suficiente una resolución de 6 Å para demostrar el plegamiento y localización de la cadena de polipéptidos de la fracción hem, pero no basta para mostrar la estructura dentro de la cadena. Con una resolución de 2 Å se pueden separar los grupos de átomos, en tanto que a 1.4 Å se pueden ver átomos individuales.

El análisis por difracción de rayos X también se usa en el estudio del DNA y fue una de las fuentes más importantes de datos que condujeron a Watson y Crick a proponer en 1953 la estructura de la doble hélice. El análisis del DNA se realiza utilizando fibras que contienen moléculas orientadas de DNA en vez de cristales y no suministra un nivel de resolución tan alto como el obtenido con proteínas.

17-9 Purificación y fraccionamiento de ácidos nucleicos

Los pasos para purificar ácidos nucleicos son muy diferentes a los empleados en la purificación de proteínas, lo que refleja las diferencias básicas en la estructura de estos dos tipos de macromoléculas. El primer paso en la purificación del DNA por lo general consiste en homogeneizar las células y aislar los núcleos de los cuales se extrae el DNA. El medio de extracción de ordinario contiene un detergente, como el DSS, que sirve para lisar los núcleos y liberar el DNA, hecho que incrementa notablemente la viscosidad de la solución. El detergente también inhibe cualquier actividad nucleasa presente en la preparación.

El principal objetivo de los subsiguientes pasos de purificación es separar el DNA de materiales contaminantes, como RNA y proteínas. La desproteinización en general se logra agitando la mezcla con un volumen de fenol. El fenol

(o alternatively cloroformo) es un desnaturizador activo de proteínas que suprime la solubilidad de las proteínas en la preparación y las precipita. Puesto que el fenol y las soluciones salinas amortiguadas no se mezclan, sólo se requiere centrifugar la suspensión para separar las fases, permaneciendo el DNA (y el RNA) en la solución dentro de la fase acuosa de arriba y la proteína presente como un precipitado floculento concentrado en la interfase. La fase acuosa se retira del tubo y se somete a ciclos repetidos de agitación con fenol y centrifugación hasta agotar toda la proteína de la solución. A continuación los ácidos nucleicos se precipitan de la solución añadiendo etanol frío. El etanol frío casi siempre forma una capa arriba de la solución acuosa de DNA, el cual se enrolla sobre una varilla de vidrio conforme sale de la solución en la interfase entre el etanol y la solución salina. En contraste, el RNA sale de la solución como precipitado floculento que se asienta en el fondo del vaso. Luego de este primer paso de purificación, se redissuelve el DNA y se trata con ribonucleasa para eliminar el RNA contaminante. A continuación se destruye la ribonucleasa mediante tratamiento con una proteasa. En seguida se quita la proteasa por desproteinización con fenol y se vuelve a precipitar el DNA con etanol. Generalmente el RNA se purifica de manera similar utilizando DNasa en los pasos finales de la purificación en vez de ribonucleasa.

Separación de los DNA mediante electroforesis en gel

De las diferentes técnicas empleadas para fraccionar proteínas, estudiadas anteriormente, la electroforesis en gel se utiliza más ampliamente en la separación de ácidos nucleicos de diferente peso molecular (longitud de nucleótidos). Las moléculas RNA o DNA pequeñas, de unos pocos cientos de nucleótidos o menos, por lo general se separan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Las moléculas de mayor tamaño tienen problemas para desplazarse a través de la cerrada trama de la poliacrilamida y en general

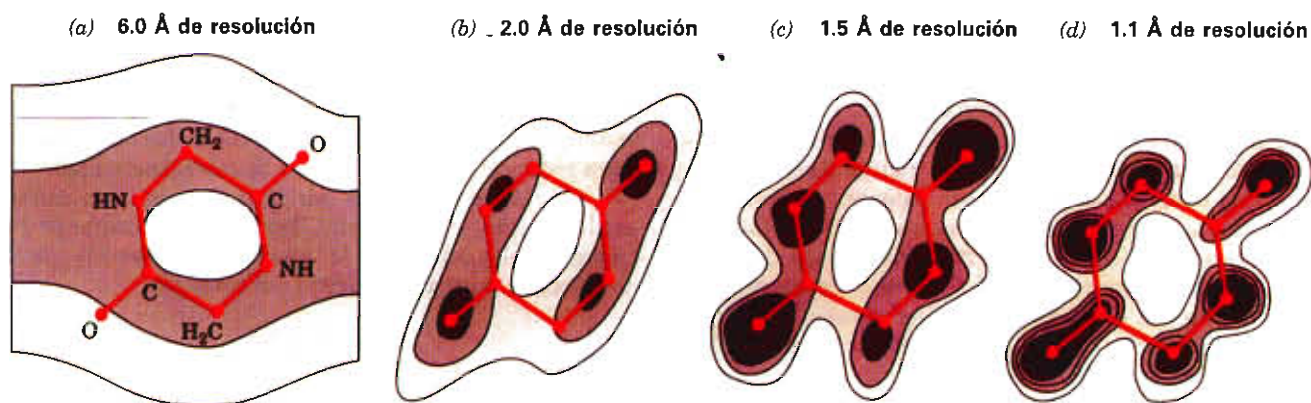


FIGURA 17-29. Distribución de la densidad electrónica de una molécula orgánica pequeña (dicetopiperazina) calculada a diferentes niveles de resolución. Con la resolución más baja (a) sólo se puede distinguir el anillo nuclear de la molécula, en tanto que a mayor resolución (d) se observa la densidad electrónica que rodea cada átomo (indicada por las líneas circulares). (Según D. Hodgkin, reimpreso con permiso de Nature 188:445, 1960; copyright 1960, Macmillan Magazines Ltd.)

se fraccionan en gel de agarosa, que tiene mayor porosidad. La agarosa es un polisacárido extraído de algas marinas; se disuelve en solución amortiguadora caliente, se vierte en un molde y luego se forma el gel descendiendo simplemente la temperatura. El gel con agarosa en baja concentración (0.3%) se emplea para separar fragmentos de DNA de mayor tamaño.

La separación de ácidos nucleicos mediante electroforesis en gel se basa en principios similares a los que operan durante el fraccionamiento de proteínas mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecilsulfato de sodio). A diferencia de las proteínas, todas las moléculas de ácido nucleico, cualquiera que sea su longitud, tienen una densidad de carga similar (número de cargas negativas por unidad de masa) y, por lo tanto, todas tienen un potencial equivalente para desplazarse en un campo eléctrico. El gel de poli(acrilamida o de agarosa suministra la resistencia necesaria para el desplazamiento, de modo que cuanto mayor sea el peso molecular de una molécula de RNA o DNA, más lentamente se desplaza a través del gel. La sensibilidad de la electroforesis en gel es tan grande que con esta técnica se pueden separar moléculas de DNA o de RNA que sólo difieren por un nucleótido, característica que le confiere un gran valor como método para secuenciar DNA (página 742). En la figura 17-30, *a*, se ilustra un ejemplo de electroforesis en gel para identificar fragmentos de RNA que contienen un gen particular, como el gen que codifica la insulina humana. En este ejemplo, los fragmentos de DNA buscados se identifican por su capacidad para enlazarse a un fragmento de DNA, explorador marcado que contiene la secuencia de la insulina. Alternativamente, se pueden localizar todos los fragmentos de DNA presentes sumergiendo el gel en una solución de bromuro de etidio, que se intercala en la doble hélice y provoca fluorescencia en las bandas de DNA cuando se observan con luz ultravioleta (fig. 17-30, *b*).

17-10 Cuantificación de las concentraciones de proteínas y ácidos nucleicos mediante espectrofotometría

Uno de los métodos más simples y utilizado con mayor extensión para determinar la cantidad de proteína o de ácido nucleico presente en una solución determinada es medir la cantidad de luz de una longitud de onda específica absorbida por la solución. El instrumento empleado para esta medición es un **espectrofotómetro**. En el capítulo 6 se mencionó que para absorber luz de una longitud de onda particular, una molécula debe absorber un quantum entero de luz, o sea, la energía que impulsa un electrón desde un orbital más bajo a uno más elevado. La energía de la luz debe equilibrar exactamente la diferencia de energía del electrón entre las dos posiciones. Si se conocen las características de absorbancia de un tipo particular de moléculas, entonces la cantidad de luz de longitud de onda apropiada absorbida por una solución de dicha molécula suministra una medida sensible de su concentración.

Para efectuar este tipo de medición, se coloca la solución en un recipiente especial de cuarzo de caras aplanadas (se emplea cuarzo porque, a diferencia del vidrio, no absor-

be luz ultravioleta), denominada *cubeta*, la cual se coloca en el trayecto del haz de luz del espectrofotómetro. La cantidad de luz que pasa a través de la solución sin absorberse, o sea la luz transmitida, se mide mediante fotoceldas situadas en el lado opuesto de la cubeta.

De los 20 aminoácidos incorporados a proteínas, dos de ellos, tirosina y fenilalanina, absorben luz en el intervalo ultravioleta, y ambos presentan una absorbancia máxima cercana a los 280 nm. Por lo tanto, si las proteínas estudiadas presentan un porcentaje típico de estos aminoácidos, la absorbancia de la solución a esa longitud de onda suministra una medida sensible de la concentración de proteínas. Alternativamente, se pueden emplear varios análisis químicos, como la técnica de Lowry o de Biuret, en la cual la proteína en solución participa en una reacción que produce una sustancia de color cuya concentración es proporcional a la concentración de la proteína. Los ácidos nucleicos presentan absorción máxima a 260 nm (fig. 10-15), y por lo tanto es la longitud de onda de referencia para medir las concentraciones de DNA o RNA.

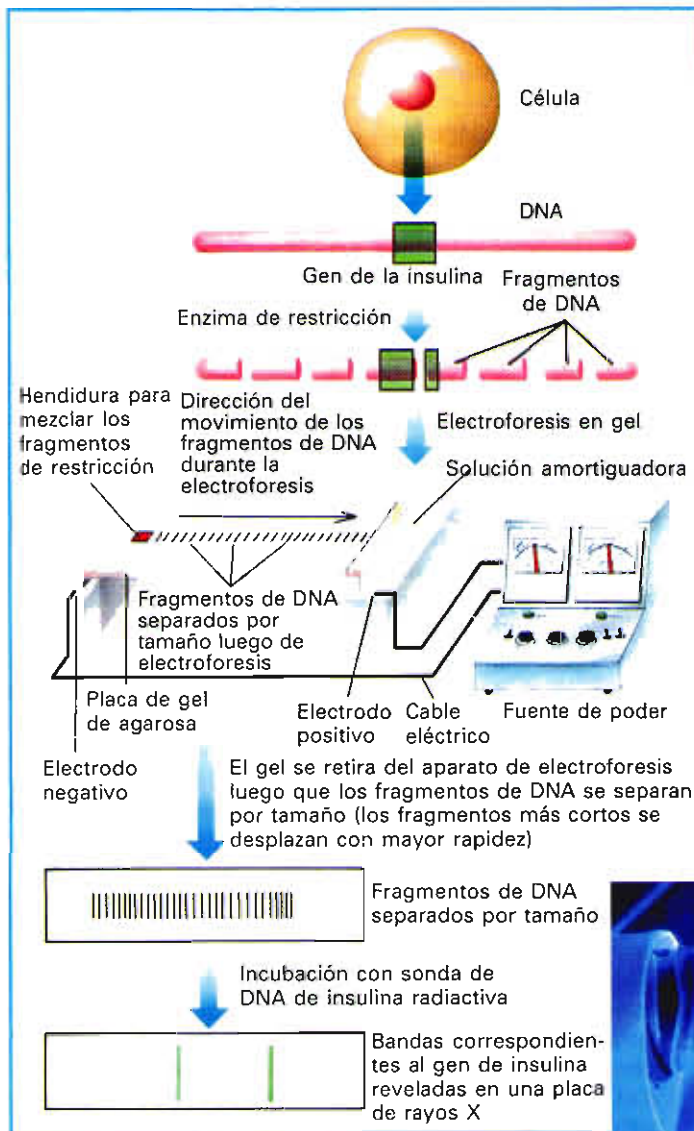
17-11 Ultracentrifugación

La experiencia común indica que la estabilidad de una solución (o suspensión) depende de la naturaleza de los componentes. La crema flota encima de la leche cruda, un precipitado fino se asienta gradualmente en el fondo del recipiente y una solución de cloruro de sodio permanece estable indefinidamente. Gran número de factores determinan si un componente dado sedimentará a partir de un medio líquido, entre los que se incluyen tamaño, forma y densidad de la sustancia, y densidad y viscosidad del medio. Para que una sustancia sedimente hacia el fondo de un tubo debe tener mayor densidad que el medio que la rodea. Incluso si la sustancia satisface el requisito de densidad, el proceso de sedimentación, que tiende a concentrar la molécula, será contrarrestado por su tendencia a redistribuirse uniformemente como resultado de la difusión. Si otros factores permanecen constantes, la sedimentación de una población particular de moléculas dependerá de su tasa de difusión comparada con la fuerza centrífuga opositora que se aplica. Las proteínas de mayor tamaño (o ácidos nucleicos) difunden más lentamente que las especies de menor tamaño. Con el desarrollo de las ultracentrífugas, en la actualidad es posible generar fuerzas centrífugas (hasta 500 000 veces mayores que la fuerza de gravedad) lo bastante intensas para provocar la sedimentación de macromoléculas.

La velocidad de una partícula determinada durante centrifugación en un medio líquido es directamente proporcional al cuadrado de la velocidad angular (ω) y la distancia de la partícula al centro del rotor (r):

$$v = s (\omega^2 r)$$

En esta ecuación, $\omega^2 r$ se denomina *aceleración radial* y está dada en centímetros por segundo al cuadrado. El término s , en segundos, es el *coeficiente de sedimentación*, equivalente a la velocidad promedio por unidad de aceleración. La aceleración centrífuga en general se expresa con relación a la



(a)

(b)



FIGURA 17-30. Separación de los fragmentos de DNA obtenidos por restricción mediante electroforesis en gel. *a)* Identificación de los fragmentos obtenidos por restricción que contienen la secuencia de nucleótidos del gen insulina. Una vez separados los fragmentos de DNA por electroforesis a través de gel de agarosa, el de DNA se extiende formando una mancha sobre una placa de papel filtro de nitrocelulosa (no mostrado en el dibujo) y luego se incuba con la sonda de DNA de insulina marcada. Luego de un periodo de incubación se lava el exceso de sonda marcada y se determina la localización de la radiactividad enlazada mediante autorradiografía. *b)* Todos los fragmentos de DNA presentes en un gel se pueden revelar sumergiendo el gel en una solución de bromuro de etidio y luego observando el gel bajo luz ultravioleta. (*b*: Fotografía por Philippe Plailly/Science Photo Library/Photo Researchers.)

aceleración gravitacional de la Tierra, que tiene un valor de 980 cm/s^2 . Por ejemplo, una aceleración radial de $4.9 \times 10^7 \text{ cm/s}^2$ equivale a 500 000 veces la fuerza gravitacional, o sea, 50 000 g.

En todo este libro nos hemos referido a diferentes macromoléculas y sus complejos mediante un valor particular *S*. La unidad *S* (o Svedberg, inventor de la ultracentrífuga) equivale a un coeficiente de sedimentación de 10^{-13} s . Puesto que la velocidad de movimiento de una partícula a través de una columna líquida depende de varios factores, incluyendo su forma, el coeficiente de sedimentación por sí mismo no suministra el peso molecular. Sin embargo, en tanto se refiera al mismo tipo de molécula, el valor *S* suministra una buena estimación del tamaño relativo. Por ejem-

plo, los tres RNA ribosómicos de *E. coli*, las moléculas 5S, 16S y 23S, poseen nucleótidos con longitud de 120, 1 600 y 3 200 bases, respectivamente.

Hay dos tipos de ultracentrífugas, modelos analíticos y modelos preparativos. Las centrífugas del tipo preparativo están diseñadas simplemente para generar grandes fuerzas centrífugas durante un periodo establecido. La centrifugación procede en un ambiente casi al vacío para reducir al mínimo la resistencia friccional. En ciertos casos, los rotores (cabezas de la centrífuga) se construyen para permitir que los tubos oscilen externamente para que las partículas se muevan en dirección paralela a las paredes del tubo. Se dice que este tipo de rotor contiene *cubetas oscilantes* (fig. 17-31). En el otro tipo de rotor, la variedad de *ángulo fijo*, los tubos

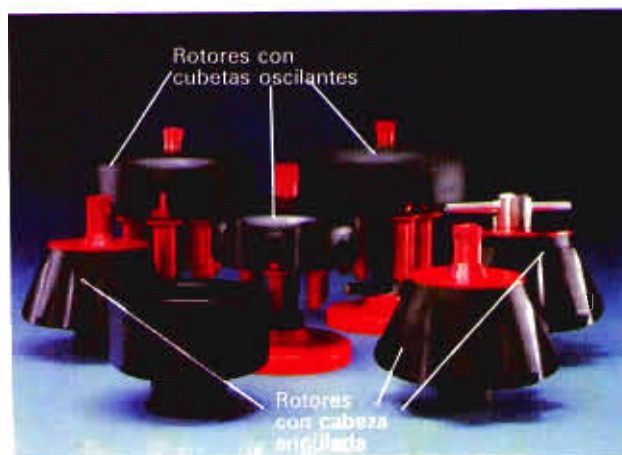


FIGURA 17-31. Variedad de rotores utilizados en una ultracentrífuga para preparación. Cada rotor tiene una hendidura en la parte inferior de la porción cilíndrica central que se adapta firmemente sobre la parte superior de un eje situado debajo de la cámara de la centrífuga. Luego de colocar el rotor sobre el eje, se cierra la tapa y se evacua el aire de la cámara antes de que el motor de la centrífuga se ponga en marcha. Se puede observar que los rotores situados hacia atrás contienen cubetas oscilantes. Conforme el rotor incrementa su velocidad, la cubeta oscila hacia afuera según se indica en la siguiente figura. Los tubos en los otros rotores se adaptan en rendijas que conservan un ángulo fijo. (Cortesía de Beckman Instruments, Inc.)

se mantienen en un ángulo oblicuo específico. En la ultracentrifugación preparativa todas las determinaciones se llevan a cabo luego de retirar el tubo de la centrífuga. El término *preparativo* se refiere al uso de este tipo de centrífuga para purificar componentes que después serán sometidos a estudios adicionales. La ultracentrifugación analítica contiene dispositivos e instrumentos que permiten seguir el avance de las sustancias en los tubos (denominados *celdas*) durante la centrifugación. Se puede estimar varias veces la velocidad de sedimentación durante el proceso de centrifugación y determinar valores de peso molecular, pureza, etcétera.

Conducta de los ácidos nucleicos durante la sedimentación

Mediante técnicas de ultracentrifugación se han analizado ampliamente moléculas de DNA (y RNA). Para el propósito presente consideraremos dos de las técnicas de centrifugación más comúnmente empleadas en el estudio de ácidos nucleicos, ilustradas en la figura 17-32. Con la técnica de *velocidad de sedimentación*, las moléculas de ácido nucleico se separan según la longitud de sus nucleótidos. La muestra que contiene la mezcla de moléculas de ácidos nucleicos se extiende cuidadosamente formando una capa sobre una solución que contiene sacarosa en concentración creciente (u otra sustancia adecuada). Este gradiente preformado incrementa su densidad (y viscosidad) de arriba hacia abajo. Cuando se somete a fuerzas centrífugas intensas, las moléculas se desplazan a través del gradiente con una velocidad determinada por su coeficiente de sedimentación. Cuan-

to mayor sea el coeficiente de sedimentación más lejos se desplazará la molécula en determinado periodo de centrifugación. Puesto que la densidad del medio es menor que la de las moléculas de ácido nucleico, incluso en el fondo del tubo (aproximadamente 1.2 g/ml para la solución de sacarosa y 1.7 g/ml para los ácidos nucleicos), estas moléculas siguen sedimentando en tanto se siga centrifugando el tubo. En otras palabras, la centrifugación nunca alcanza el equilibrio. Luego del periodo descrito, se retira el tubo de la centrífuga, se fracciona su contenido (como se muestra en la figura 17-32, c) y se determina la posición relativa de las diferentes moléculas. La presencia de la sacarosa viscosa evita que las moléculas contenidas en el tubo se mezclen por convección o durante el manejo, lo que permite que moléculas de valor *S* idéntico permanezcan en su sitio formando una banda. En presencia de moléculas marcadoras con coeficiente de sedimentación conocido, se puede calcular el valor *S* desconocido de los otros componentes.

En el otro tipo de centrifugación analítica, *sedimentación de equilibrio* (o *isopícnica*) (fig. 17-32, b), las moléculas de ácido nucleico se separan según su densidad de flotación. En este procedimiento por lo general se emplea una solución salina altamente concentrada del metal pesado cesio. El análisis se inicia mezclando el DNA con una solución de cloruro o sulfato de cesio en el tubo de la centrífuga y luego sometiendo el tubo a centrifugación prolongada (p. ej., dos a tres días con fuerza intensa). Durante la centrifugación, los iones pesados de cesio se desplazan muy lentamente hacia el fondo del tubo estableciendo un gradiente continuo de densidad a través de la columna líquida. Después de un tiempo, la tendencia de los iones a concentrarse en el fondo del tubo será contrarrestada por la tendencia opuesta de los mismos a redistribuirse por difusión y el gradiente se estabiliza. Conforme se va formando el gradiente de cesio, las moléculas individuales de DNA se dirigen hacia abajo o flotan hacia arriba en el tubo hasta alcanzar una posición donde la densidad de flotación equivale a su propia densidad, y en ese punto ya no están sometidas a movimiento adicional alguno. Moléculas de densidad equivalente forman bandas estrechas dentro del tubo. Esta técnica es lo bastante sensible para separar moléculas de DNA con diferente composición de bases (como se ilustra en la figura 17-32, b) o aquellas que contienen diferentes isótopos de nitrógeno (^{15}N en comparación con ^{14}N , como se muestra en la figura 13-3).

Hibridación de ácidos nucleicos

Hibridación de ácido nucleico es un término para describir varias técnicas relacionadas basadas en la observación de que dos moléculas de ácido nucleico de cadena simple con secuencias complementarias de bases forman un híbrido de doble cadena. Consideremos una situación donde se tiene una mezcla de cientos de fragmentos de DNA de longitud idéntica y composición total de bases que sólo difiere en su secuencia de bases. Se puede asumir, por ejemplo, que uno de los fragmentos de DNA constituye una parte del gen de globina β y los otros fragmentos contienen genes no relacionados. La única manera de distinguir entre el fragmento

que contiene la información para el polipéptido de globina β y todos los otros es efectuar un experimento de hibridación molecular utilizando moléculas complementarias como fragmentos exploradores.

En el presente ejemplo, incubando la mezcla de fragmentos de DNA desnaturalizados con un exceso de RNAm de globina β , los fragmentos de globina formarían híbridos DNA-RNA de doble cadena, aislando los otros fragmentos de DNA de cadena simple. Hay varias maneras de separar los híbridos de los fragmentos de cadena simple. Por ejemplo, se puede pasar la mezcla a través de una columna de hidroxapatita en condiciones iónicas que obliguen a los híbridos a enlazarse a las sales de fosfato de calcio en la columna, en tanto que las moléculas de DNA no hibridadas pueden pasar a través de la misma sin enlazarse. A continuación, los híbridos pueden liberarse de la columna cambiando la concentración del amortiguador eluyente.

En los experimentos de hibridación de ácidos nucleicos es necesario incubar dos poblaciones de ácidos nucleicos de cadenas simples complementarias en condiciones (fuerza iónica, temperatura, etc.) que promuevan la formación de moléculas de doble cadena. Según el tipo de experimento, las dos poblaciones de moléculas reactantes pueden estar en solución o una de las poblaciones estar inmovilizada, por ejemplo, adsorbida a un filtro o localizada en un cromosoma.

En experimentos de hibridación con frecuencia una de las poblaciones de ácidos nucleicos de cadena simple está inmovilizada dentro de un gel para electroforesis. Por ejemplo, la huella digital de DNA mostrada en la figura 10-23 se obtuvo fraccionando una mezcla de fragmentos restrictivos mediante electroforesis, desnaturalizando el DNA, transfiriendo las fragmentos de cadena única a un pedazo de papel filtro de nitrocelulosa (formando una mancha) y luego incubando el filtro con un fragmento explorador de DNA de cadena simple marcado con radiactividad capaz de hibridar un grupo de fragmentos complementarios. A continuación, se lavó la radiactividad no enlazada y se determinó la localización del fragmento explorador unido mediante autorradiografía. Este procedimiento para identificar fragmentos de DNA específicos, fraccionados median-

te electroforesis en gel por medio de fragmentos de DNA marcados (sondas) se denomina mancha Southern (por Edward Southern, quien lo desarrolló). En una mancha Southern se pueden identificar uno solo o unos cuantos

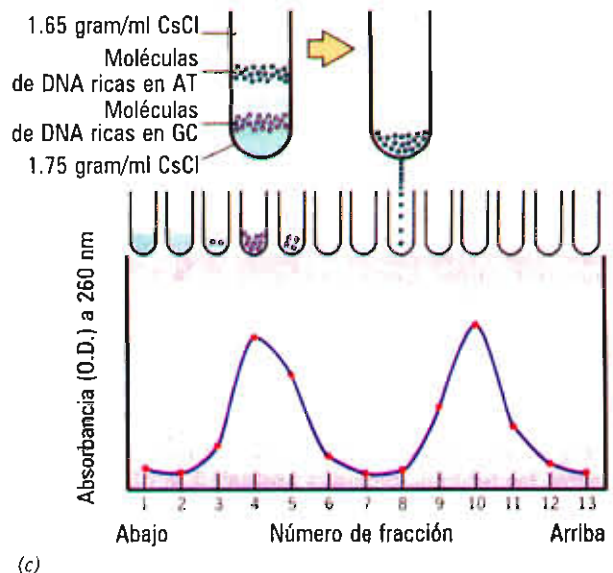
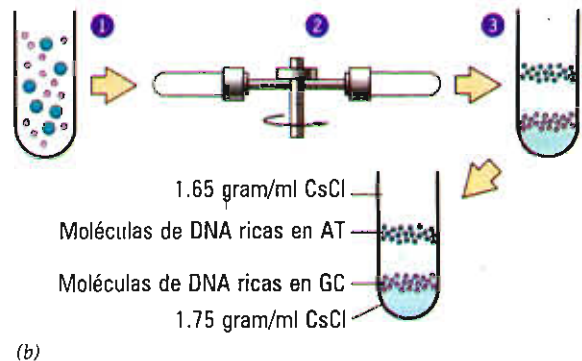
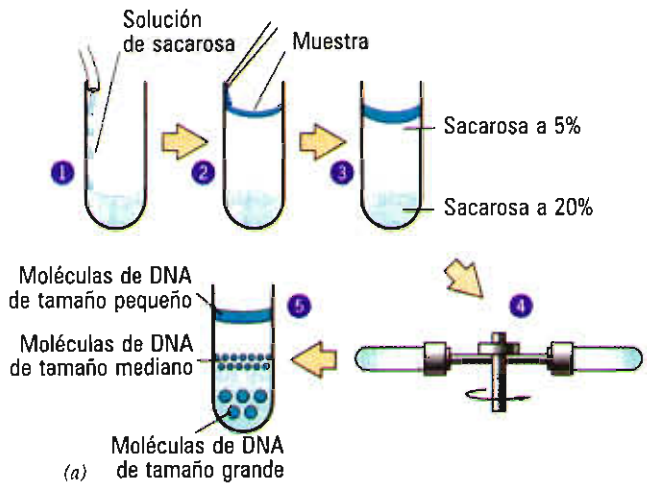


FIGURA 17-32. Técnicas de sedimentación de ácido nucleico. a) Separación de moléculas de DNA de tamaño diferente por la velocidad de sedimentación. Se forma un gradiente de densidad de sacarosa dentro del tubo (paso 1) permitiendo que una solución de sacarosa de concentración gradualmente mayor escurra a lo largo de la pared del tubo. Una vez formado el gradiente, la muestra se extiende con cuidado formando una capa arriba del gradiente (pasos 2 y 3) y se somete el tubo a centrifugación (p. ej., 50 000 rpm durante cinco horas), según se ilustra en el paso 4. Las moléculas de DNA se separan según su tamaño (paso 5). b) Separación de moléculas de DNA mediante sedimentación en equilibrio conforme la diferencia de densidad de flotación. La muestra de DNA se mezcla con una solución CsCl (paso 1) y se somete a centrifugación prolongada (p. ej., 50 000 rpm durante 72 horas) (paso 2). Durante la centrifugación se forma el gradiente CsCl y entonces las moléculas de DNA forman bandas en regiones de densidad equivalente (paso 3). c) Se punzona el tubo utilizado en el experimento b y se permite derramar el contenido en tubos sucesivos, fraccionando por lo tanto el contenido del tubo. Se mide la absorbancia de la solución en cada fracción y se elabora una gráfica como la mostrada.

fragmentos de restricción que contienen una secuencia particular de nucleótidos, aun si hay miles de fragmentos no relacionados en el gel. Las moléculas de RNA separadas por electroforesis también se pueden identificar con una sonda de DNA marcada luego de practicar una mancha sobre un filtro de nitrocelulosa. En la figura 11-37 se muestra un ejemplo de este procedimiento, llamado mancha Northern.

La hibridación de ácido nucleico también se puede emplear para estimar la similitud de la secuencia de nucleótidos entre dos muestras de DNA obtenidas, por ejemplo, de dos organismos diferentes. Cuanto más distantes se encuentren evolutivamente las dos especies, mayor será la divergencia de sus secuencias de DNA. Si se mezcla el DNA purificado de las especies A y B, se desnaturaliza y se permite su reconstitución, un porcentaje de los dúplex de DNA será formado por cadenas de DNA procedentes de ambas especies. Puesto que contienen pares improprios de bases, estos dúplex son menos estables que los formados por cadenas de DNA de la misma especie, y esta inestabilidad se refleja por la menor temperatura a la cual se funden. Cuando se permite la reconstitución de DNA de diferentes especies en diferentes combinaciones, la temperatura de fusión (T_f , página 403) de los dúplex híbridos suministra una medida de la distancia evolutiva entre los dos organismos.

17-12 Tecnología del DNA recombinante

Durante los últimos dos decenios se lograron enormes avances en el análisis de genomas eucariotas. Estos adelantos se lograron cuando los biólogos moleculares aprendieron a construir moléculas de **DNA recombinante**, que son moléculas que contienen secuencias derivadas de más de una fuente. El DNA recombinante se puede usar de mil maneras; comenzaremos considerando una de sus aplicaciones más importantes: aislar un segmento de DNA particular que codifica un polipéptido específico.

Supongamos que nos interesa aislar el gen que codifica la insulina humana de modo que pueda sintetizarse *in vitro* esta importante proteína. El genoma humano contiene unos 3 000 millones de pares de bases, en tanto que el gen de la insulina sólo constituye unos cuantos cientos de estos nucleótidos. Uno de los primeros pasos para aislar el gen de la insulina es fragmentar las grandes moléculas de DNA extraídas de células humanas en una población definida de fragmentos más pequeños mediante incubación con enzimas restrictivas. Como se analizó en la página 418, las enzimas restrictivas reconocen secuencias específicas (*sitios de restricción*) de cuatro a ocho nucleótidos y efectúan cortes en sitios específicos sobre ambas cadenas del dúplex. Puesto que en toda la longitud de las cadenas las secuencias particulares de nucleótidos ocurren con demasiada frecuencia simplemente por azar, aparecen en todos los tipos de DNA (viral, bacteriano, vegetal y animal) y por lo tanto son susceptibles de ser fragmentadas por estas enzimas.

El DNA recombinante se puede formar de diferentes maneras. En el método mostrado en la figura 17-33, las

moléculas de DNA de dos fuentes diferentes se tratan con una enzima de restricción que ejecuta cortes escalonados en el dúplex de DNA. Estos cortes dejan en las cadenas simples apéndices cortos que actúan como “extremos pegajosos” que se pueden enlazar a otros apéndices complementarios de una cadena única de otra molécula de DNA para restablecer una molécula de doble cadena.² En el caso mostrado en la figura 17-33, una de las preparaciones de fragmentos de DNA se obtiene añadiendo una enzima restrictiva a una preparación de plásmidos bacterianos purificados, que son moléculas de DNA pequeñas, circulares, de doble cadena que fueron separadas del cromosoma bacteriano principal. La otra preparación de fragmentos de DNA mostrada en la figura 17-33 se obtuvo mediante tratamiento de DNA extraído de células humanas con la misma enzima restrictiva.

Podemos asumir que uno de los fragmentos contiene el gen de la insulina que se intenta purificar. Este fragmento particular sólo representa una minúscula porción del número total de fragmentos formados. La meta es aislar el fragmento buscado de esta gran población heterogénea. El primer paso hacia dicho objetivo es incubar las preparaciones de DNA de plásmido y humano en presencia de un DNA ligasa para formar recombinantes circulares que contienen los dos tipos de fragmentos de hidrógeno unidos entre sí mediante un par de bases. Las primeras moléculas de DNA recombinante fueron formadas con este método en 1973 por Paul Berg, Herbert Boyer, Annie Chang y Stanley Cohen, de la Universidad Stanford y de la Universidad de California, en San Francisco, dando origen a la moderna ingeniería genética.

Siguiendo este procedimiento que acabamos de describir se puede ahora producir un gran número de diferentes moléculas recombinantes, cada una de las cuales contiene un plásmido bacteriano con un segmento de DNA humano incorporado en su estructura circular. Puesto que el objetivo es obtener preparaciones purificadas de un tipo de DNA recombinante que contenga el fragmento que codifica insulina, se debe separar este fragmento único de todos los demás. Esto se logra mediante un proceso denominado clonación del DNA. Retornaremos a la búsqueda del gen de la insulina luego de describir la metodología básica de la clonación del DNA.

Clonación del DNA

La **clonación del DNA** es una técnica fundamental para producir grandes cantidades de un segmento de DNA específico. El segmento de DNA que debe clonarse primero se une a un **DNA vector**, que es un vehículo para transportar DNA extraño a una célula huésped adecuada, como la bacteria *E. coli*. El vector contiene secuencias que le permiten duplicarse dentro de la célula huésped. Comúnmente se

² El DNA recombinante también se puede formar a partir de fragmentos de DNA generados por enzimas restrictivas que producen extremos romos. Los extremos del plásmido y del fragmento de restricción se modifican subsecuentemente para permitirles “pegarse” entre sí.

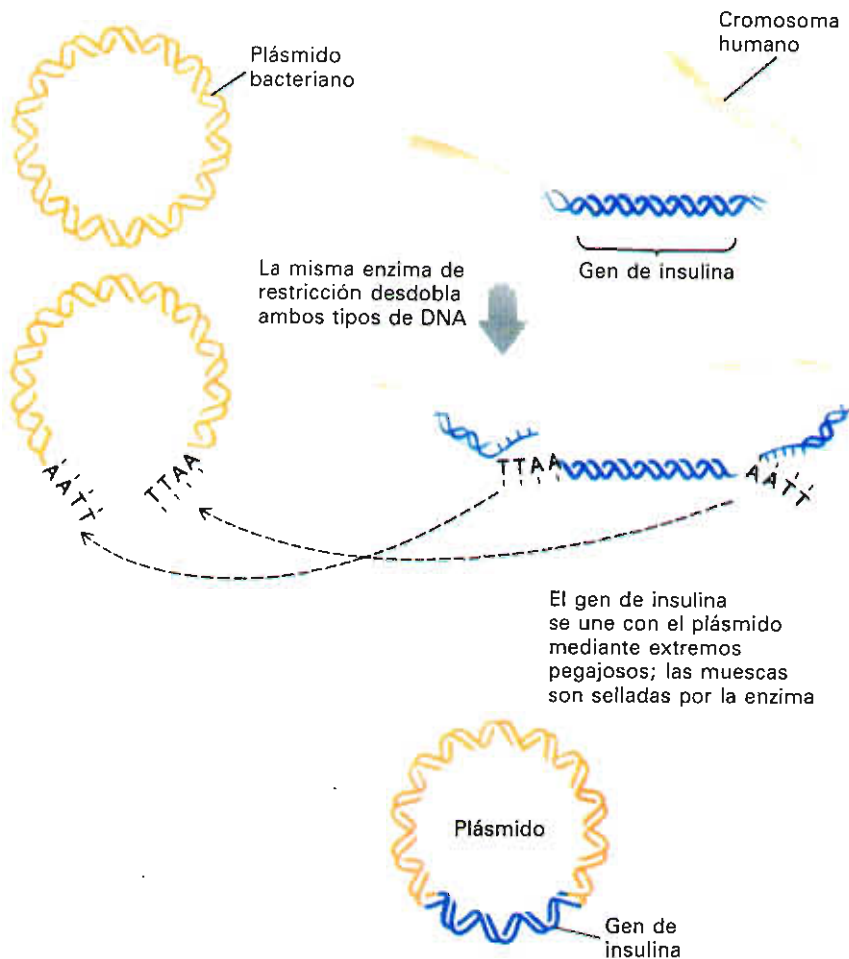


FIGURA 17-33. Formación de una molécula de DNA recombinante. En este ejemplo se trata de DNA de un plásmido y de DNA humano, ambos conteniendo el gen de la insulina, con la misma enzima de restricción, de modo que el DNA de ambas fuentes forme "extremos aglutinantes" complementarios. Como resultado, las dos moléculas de DNA se unen mediante enlaces no covalentes y luego son selladas por enlaces covalentes por la ligasa de DNA, formando una molécula de DNA recombinante.

usan dos tipos de vectores para clonar DNA dentro de bacterias huésped. En una técnica, el segmento de DNA que será clonado se introduce a un plásmido, según se describió anteriormente, y luego se junta a una célula bacteriana cuando dicha célula bacteriana capta el plásmido del medio. En una técnica alternativa, el segmento de DNA se une a una porción del genoma del virus bacteriano lambda (λ) y luego se permite que este virus infecte un cultivo de células bacterianas produciendo un gran número de virus, cada uno conteniendo el segmento de DNA extraño. De cualquier manera, una vez que el segmento de DNA se encuentra en el interior de la bacteria será duplicado junto con el de DNA bacteriano (o viral) y repartido a las células hijas (o prole de las partículas virales). Así, el número de moléculas de DNA recombinante se incrementa en proporción al número de células bacterianas (o prole viral) que se forma. Si se empieza con un solo plásmido recombinante o un genoma viral dentro de una sola célula bacteriana, en corto plazo se formarán millones de copias de DNA. Una vez que por amplificación se alcanza la cantidad deseada de DNA, se puede purificar el DNA recombinante y emplear en otros procedimientos. Además de proporcionar un medio para amplificar la cantidad de una secuencia de DNA particular, la clonación también se puede emplear como técnica para

aislar en forma pura cualquier fragmento de DNA específico entre una gran población heterogénea de moléculas de DNA. Iniciaremos el análisis de la clonación de DNA utilizando plásmidos bacterianos.

Clonación de DNA eucariota en plásmidos bacterianos

El DNA extraño que debe clonarse se introduce en el plásmido para formar una molécula de DNA recombinante. Los plásmidos empleados para la clonación de DNA son versiones modificadas de los observados en células bacterianas. Igual que sus contrapartes naturales de las cuales se derivan, estos plásmidos contienen un origen de duplicación y uno o más genes que confieren a la célula receptora resistencia contra uno o más antibióticos (página 98). La resistencia a los antibióticos permite a los investigadores seleccionar las células que contienen el plásmido recombinante.

Como demostraron por primera vez Avery, Macleod y McCarty (página 427), las células bacterianas pueden captar DNA de su medio. Este fenómeno, conocido como transformación, constituye la base para la clonación de plásmidos en células bacterianas (fig. 17-34). En este procedimiento, a un cultivo bacteriano pretratado con iones calcio se añaden plásmidos recombinantes, cada uno con diferente

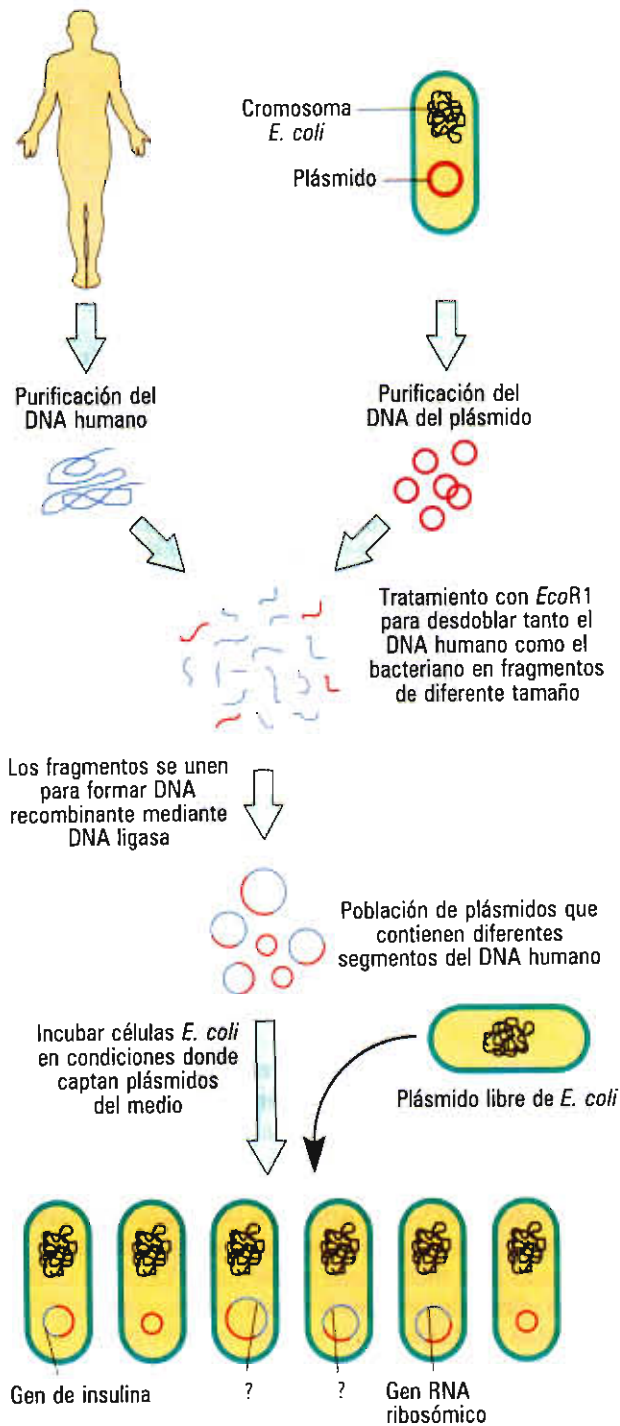


FIGURA 17-34. Ejemplo de clonación de DNA utilizando plásmidos bacterianos. Se extrae DNA de células humanas, fragmentado con *EcoRI*, y los fragmentos se introducen en una población de plásmidos bacterianos. Una vez que las células bacterianas captan un plásmido del medio, estas células originan una colonia que contiene la molécula de DNA recombinante. En este ejemplo, la mayor parte de las bacterias contienen DNA eucariota de función desconocida (?), en tanto que una contiene una porción del DNA que codifica RNA ribosómico y otra contiene DNA que codifica insulina.

DNA extraño. Cuando estas bacterias se someten a un breve choque de calor, se estimulan para captar DNA de su medio. De ordinario sólo un porcentaje muy pequeño de las células tiene capacidad para captar y retener una de las moléculas de plásmido recombinante. Una vez captado, el plásmido se duplica de manera autónoma dentro de la célula receptora pasando a su progenie durante la división celular. Las bacterias que contienen el plásmido se pueden seleccionar porque crecen en presencia del antibiótico contra el cual confiere resistencia el gen introducido al plásmido. Después de alcanzar la cantidad de amplificación deseada, se cosechan las células, se extrae el DNA y el plásmido de DNA recombinante se puede separar con facilidad del cromosoma bacteriano mucho más grande (fig. 17-35). También se pueden tratar plásmidos recombinantes aislados con la misma enzima restrictiva utilizada en su síntesis, la cual libera los segmentos de DNA clonados del resto de DNA que sirvió como vector. A continuación, el DNA clonado se puede separar del plásmido.

Iniciamos este comentario teniendo como objetivo estudiar el procedimiento para aislar un pequeño fragmento de DNA que contiene la secuencia del gen de la insulina. Para lograrlo, se formó una gran población de diferentes plásmi-



FIGURA 17-35. Separación del DNA de un plásmido del DNA de un cromosoma bacteriano principal. Se puede observar que este tubo de centrifugación contiene dos bandas, una del DNA del plásmido portador de un segmento de DNA extraño clonado dentro de la bacteria y la otra contiene DNA cromosómico procedente de la misma bacteria. Los dos tipos de DNA se separan durante la centrifugación. El investigador retira el DNA del tubo con aguja y jeringa. El DNA dentro del tubo se puede hacer visible utilizando el compuesto bromuro de etidio que se enlaza al DNA y que provoca fluorescencia bajo luz ultravioleta. (Fotografía de Ted Spiegel/Black Star.)

dos recombinantes, unos pocos con el gen buscado (como en la figura 17-35). Uno de los grandes beneficios de la clonación del DNA es que además de producir grandes cantidades de un DNA particular permite separar diferentes DNA de una mezcla. Al principio se hizo notar que las bacterias que contienen plásmidos se pueden seleccionar mediante tratamiento con antibióticos. Una vez efectuado este tratamiento, las células que poseen plásmidos se pueden sedimentar a baja densidad sobre placas de Petri, de modo que toda la progenie de cada célula (un clono de células) permanezca físicamente separada de la progenie de otra célula. Dado el gran número de diferentes plásmidos recombinantes inicialmente presentes en el medio, diferentes células sobre el plato de cultivo contienen diversos fragmentos de DNA extra-

ños. Luego que las células que contienen los distintos plásmidos crecen en colonias separadas, el investigador puede identificar entre las colonias aquellas pocas que contienen el gen buscado, en este caso el gen de la insulina.

En los platos de cultivo que contienen colonias bacterianas (o placas de fagos) se investiga la presencia de una secuencia de DNA particular empleando las técnicas combinadas de duplicación de placas e *hibridación in situ*. Según se ilustra en la figura 17-36, a, la duplicación de placas permite preparar un gran número de platos de cultivo que contienen colonias representativas de una misma bacteria precisamente en la misma posición en cada plato. A continuación se emplea una de las réplicas para localizar la secuencia de DNA buscada (fig. 17-36, b), procedimiento que requiere lisar las células y fijar el DNA sobre la superficie de un filtro. Una vez fijado el DNA en su sitio, se desnaturaliza como preparación para *hibridación in situ* (pág. 407), durante la cual el filtro se incuba con una sonda de DNA marcada que contiene la secuencia complementaria a la buscada. Después de la incubación, la sonda no hibridada se lava del filtro y se determina la localización de los híbridos marcados mediante autorradiografía. Se puede entonces seleccionar representativos vivientes de los clones identificados a partir de las réplicas y desarrollar las células aisladas en cultivos de mayor amplitud, de modo que el fragmento de DNA deseado, como el portador de la secuencia para el gen de la insulina, se pueda aislar en estado puro.

Aunque es fácil la búsqueda de un solo gen humano utilizando el procedimiento justamente descrito, no es un método práctico puesto que la clonación de cientos de miles de diferentes fragmentos de DNA (en cientos de miles de diferentes colonias bacterianas) requiere cientos de platos de Petri separados. Más bien, este tipo de experimento se efectúa mejor utilizando un vector viral en vez de un vector plásmido, como se explica a continuación.

Clonación del DNA eucariota en genomas de fago

El otro vector importante para clonación es el bacteriófago lambda, que se muestra en la figura 17-37. El genoma de lambda es una molécula de DNA lineal de doble cadena, aproximadamente de 50 kb de longitud. La cepa modificada que se emplea en la mayor parte de los experimentos de clonación contiene dos sitios de desdoblamiento para la enzima *EcoR1*, que fragmenta el genoma en tres grandes segmentos. Afortunadamente, toda la información indispensable para el desarrollo de una infección está contenida en los dos segmentos exteriores, de modo que el fragmento medio

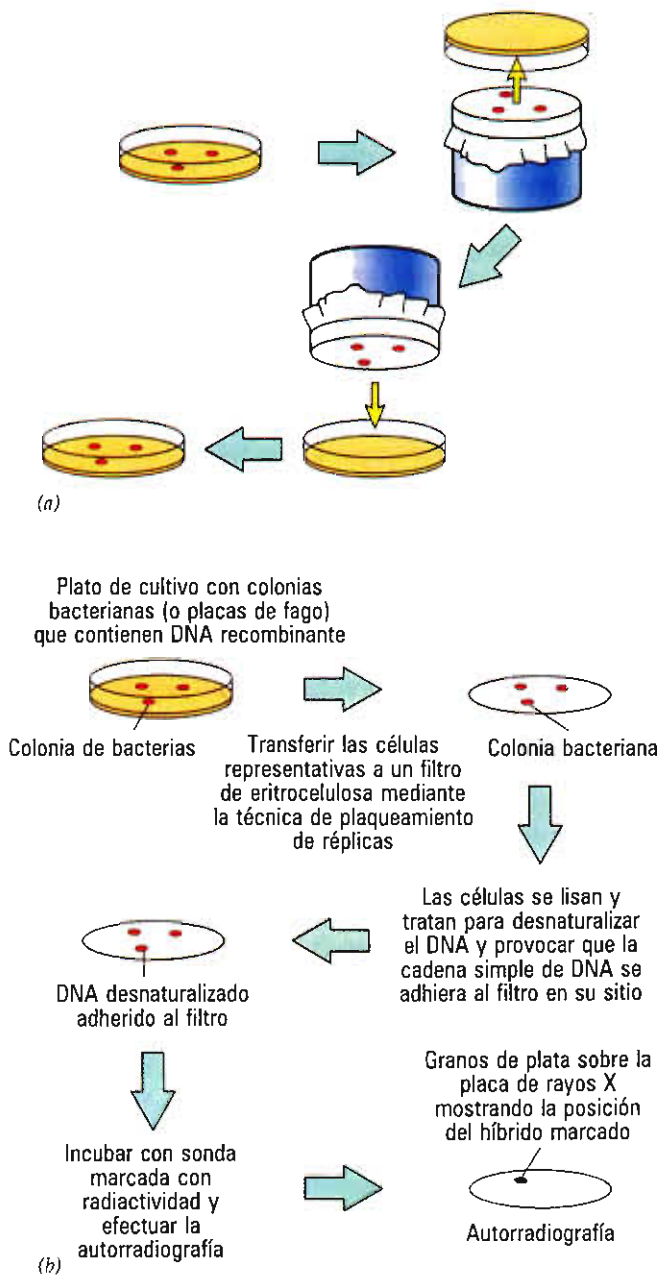


FIGURA 17-36. Localización de una colonia bacteriana que contiene la secuencia de DNA deseada mediante réplica en placa e *hibridación in situ*. a) Una vez que las placas de células bacterianas del plato de cultivo se desarrollan en colonias, dicho plato se invierte sobre un pedazo de papel filtro y se permite que algunas de las células de cada colonia se adsorban al papel. A continuación se inocula el plato de cultivo vacío presionándolo contra el papel filtro para producir placas réplica. b) Procedimiento para seleccionar las células de un plato de cultivo para las colonias que contienen el DNA recombinante de interés. Una vez identificadas las colonias relevantes, se pueden quitar las células del plato original y desarrollarlas por separado para producir grandes cantidades de los fragmentos de DNA buscados.

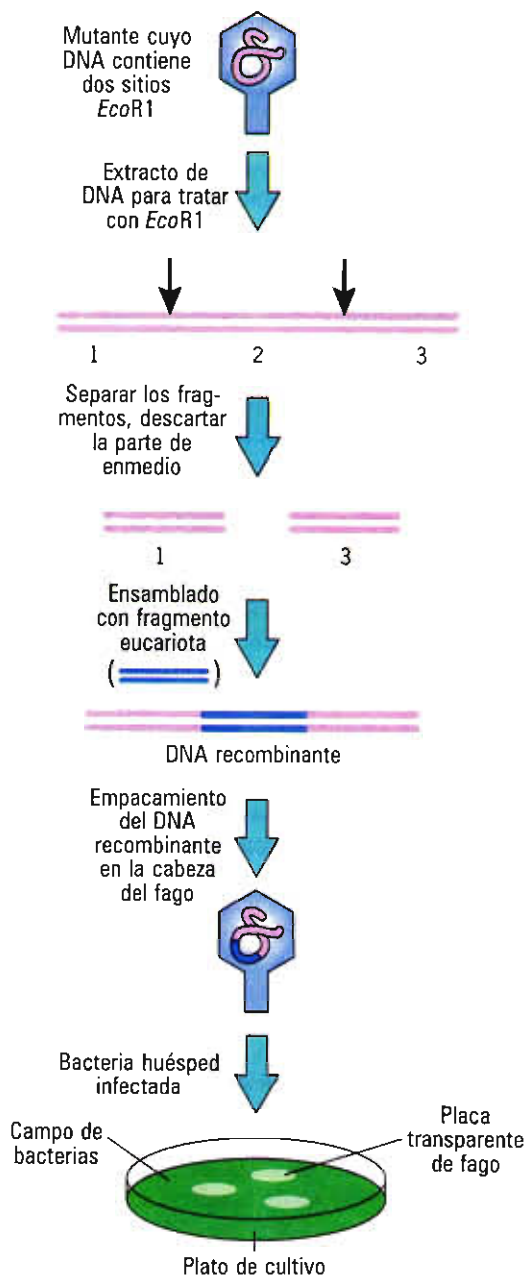


FIGURA 17-37. Protocolo para la clonación de fragmentos de DNA eucariotas en el fago lambda. Los pasos se describen en el texto.

sustituible se puede reemplazar con un fragmento de DNA hasta de 25 kb, aproximadamente. Se pueden empaquetar *in vitro* moléculas de DNA recombinante en las cabezas del fago, y emplear estas partículas de fago manipuladas genéticamente para infectar bacterias huésped. Una vez dentro de la bacteria, el segmento de DNA eucariota se amplifica junto con el DNA viral y luego se empaqueta en una nueva generación de partículas virales liberadas cuando la célula sufre lisis. Las partículas liberadas infectan nuevas células y pronto se observa un punto transparente (o *placa*) en el "tejido" bacteriano sobre el sitio de infección. Cada placa con-

tiene millones de partículas de fago y cada una es portadora de una sola copia del mismo fragmento de DNA eucariota.

Lambda es particularmente atractivo como vector para clonación porque el DNA se encuentra bien empaquetado en una forma fácil de almacenar y de extraer. Más aún, en un solo plato de Petri se pueden acomodar más de 10 000 diferentes placas. Por lo contrario, el mismo plato de cultivo sólo tiene espacio para unas cuantas colonias bacterianas portadoras de plásmidos recombinantes. Una vez formadas las placas de fago, se identifica un fragmento particular por un proceso similar al de duplicación de placas e hibridación *in situ* descritas en la figura 17-36 para la clonación de plásmidos recombinantes.

Formación de una biblioteca de DNA. Una de las razones más útiles para clonar los fragmentos genómicos es producir **bibliotecas de DNA**, que son conjuntos de fragmentos de DNA que representan todo el genoma de un organismo. En una de las técnicas para la formación de una biblioteca de DNA, el DNA genómico se trata con una o dos enzimas restrictivas que reconocen secuencias muy cortas de nucleótidos en condiciones de concentración enzimática baja, de modo que sólo se desdobra un pequeño porcentaje de sitios realmente susceptibles. Las dos enzimas usadas comúnmente que reconocen secuencias de tetranucleótidos son *HaeIII* (reconoce GGCC) y *Sau3A* (reconoce GATC). Sería de esperar que si un tetranucleótido dado ocurre por azar con frecuencia tan elevada, cualquier segmento cuantificable de DNA será sensible a la fragmentación. Una vez digerido parcialmente el DNA, el producto de la digestión se fracciona mediante electroforesis en gel y los fragmentos de tamaño adecuado (p. ej., 20 kb de longitud) se seleccionan para incorporar las partículas del fago lambda y usarlas para producir el medio millón, aproximadamente, de placas necesarias para garantizar que esté representado todo segmento simple de un genoma de mamífero.

Puesto que se seleccionan grandes pedazos de DNA luego del tratamiento con enzimas en condiciones en las cuales la mayor parte de los sitios susceptibles no se han desdoblado, para todo propósito práctico el DNA ha sido fragmentado al azar. Una vez producidos los fagos recombinantes se pueden almacenar para uso posterior y de esta manera constituyen un conjunto permanente de todas las secuencias de DNA presentes en el genoma de las especies. Siempre que un investigador desea aislar una secuencia particular de la biblioteca, se puede desarrollar el fago dentro de la bacteria y analizar las diferentes placas (cada una originada a partir de la infección de un solo fago recombinante) en busca de la presencia de dicha secuencia.

El uso de DNA desdoblado al azar tiene una ventaja en la elaboración de una biblioteca porque genera fragmentos superpuestos que se pueden emplear en el análisis de regiones de los cromosomas que se extienden en ambas direcciones a partir de una secuencia particular, técnica conocida como *marcha de cromosoma*. Por ejemplo, si se aísla un fragmento que contiene la región que codifica un gen de globina, ese fragmento particular se puede marcar y utilizar como sonda para aislar fragmentos con los cuales se superpone. A continuación, se repite el proceso utilizando los nuevos fragmentos como sondas marcadas en sucesivos pasos de la búsqueda, y de esta manera gradualmente se

aísla una parte cada vez más larga de la molécula de DNA original. Utilizando esta técnica se puede estudiar la organización de secuencias relacionadas en una amplia región del cromosoma.

Clonación de fragmentos de DNA más grandes en vectores de clonación especializados

Ni los plásmidos ni los vectores fago lambda son adecuados para clonar DNA de mayor tamaño que 20 kb a 25 kb de longitud. Se han desarrollado varios vectores que permiten a los investigadores clonar fragmentos de DNA de tamaño mucho mayor. El más importante de estos vectores se denomina **cromosoma artificial de levadura (CAL)**. Como su nombre implica, estos elementos de clonación son versiones artificiales de un cromosoma normal de levaduras. Contienen todos los elementos de un cromosoma de levadura necesarios para duplicar la estructura durante la fase S y separar las células hijas durante la mitosis, incluyendo uno o más orígenes de duplicación, telómeros en los extremos de los cromosomas y un centrómero al cual se pueden unir las fibras del huso durante la separación de los cromosomas. Además de estos elementos, los CAL contienen en su estructura: 1) un gen que codifica un producto para seleccionar células que contienen CAL y separarlas de las que carecen de dicho elemento, y 2) el fragmento de DNA que se quiere clonar. Igual que otras células, las células de levadura captan DNA de su medio (pág. 738), lo que suministra la técnica para introducir CAL en las células.

Los fragmentos de DNA clonados en CAL típicamente varían de 100 kb a 1 000 kb (un millón de pares de bases) de longitud. Los fragmentos de dimensiones tan grandes de ordinario producidos por tratamiento de DNA con enzimas restrictivas que reconocen secuencias de nucleótidos particularmente largas (7 a 8 nucleótidos), contienen dinucleótidos CG. Como se hizo notar en la página 523, los dinucleótidos CG tienen una función especial en el genoma del mamífero y al parecer ésta es la razón de que no aparezcan con la frecuencia pronosticada en base a la probabilidad. La enzima restrictiva *NotI*, por ejemplo, reconoce la secuencia de ocho nucleótidos GCGGCCGC, que típicamente desdobra el DNA de mamíferos en fragmentos de casi millón de pares de bases de largo. Los fragmentos de esta longitud se pueden incorporar a un CAL y clonar dentro de células huésped de levadura. El desarrollo de la tecnología de CAL ha sido un elemento clave en el éxito del proyecto del genoma humano (pág. 417).

Clonación de DNAC

Hasta este punto, el análisis se ha restringido a la clonación de fragmentos de DNA aislados del DNA extraído, o sea, fragmentos genómicos. Cuando se trabaja con DNA genómico, en general se intenta aislar un gen particular o una familia de genes entre cientos de miles de secuencias no relacionadas. Además, el aislamiento de fragmentos genómicos permite estudiar varios temas, incluyendo: 1) las secuencias reguladoras que flanquean la porción codificante de un gen; 2) las secuencias no codificantes interpuestas; 3) los diferentes miembros de una familia multigen que con frecuencia están en íntima proximidad en el genoma; 4) evolución de las secuencias de DNA, incluyendo su dupli-

cación y redistribución, como se observa al comparar DNA de especies diferentes, y 5) la dispersión interna de elementos genéticos desplazables.

La clonación del DNAC ha demostrado ser muy importante en el análisis de la estructura y expresión de los genes. Para clonar DNAC, se aísla una población de RNAm y luego se utiliza como plantilla para formar un complemento de DNA de una sola cadena (fig. 17-38), la cual posteriormente se convierte en una población de doble cadena mediante una de DNA polimerasa y luego se combina con el vector deseado. Las poblaciones de RNA mensajero típicamente contienen miles de especies diferentes, e igual que en los experimentos donde se emplean fragmentos de DNA genómico, se deben rastrear los clones para aislar una secuencia

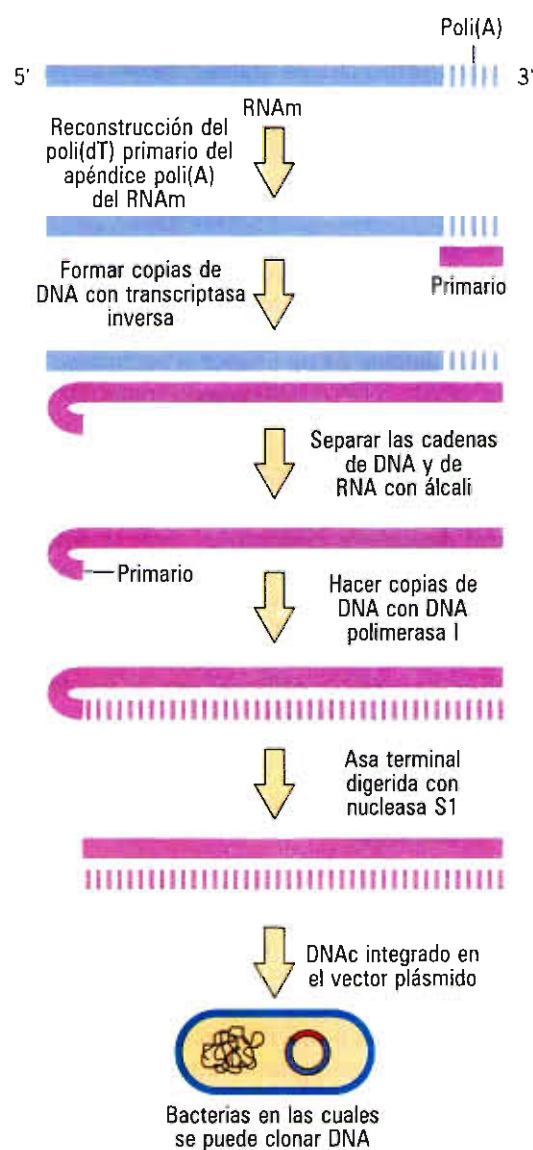


FIGURA 17-38. Síntesis de DNAC para clonación en un plásmido. En el segundo y cuarto pasos se requieren iniciadores, porque ni la enzima polimerizante de DNA (transcriptasa inversa o DNA polimerasa I) pueden iniciar la síntesis de una cadena de DNA; ambas requieren 3' OH libre del iniciador.

particular a partir de poblaciones heterogéneas de moléculas recombinantes. El análisis del DNAc clonado satisface varios objetivos. Generalmente es más fácil estudiar una población diversa de DNAc que la correspondiente población de RNAm, por lo que se puede usar el DNAc para conocer algo más acerca de la variedad de RNAm presente en una célula, el porcentaje de RNAm compartido por dos tipos diferentes de células, o el número de copias RNAm presente en una célula. Una sola especie de DNAc amplificado también es una molécula muy útil. El DNAc sólo contiene la información presente en el RNAm, por lo que la comparación entre el DNAc y su correspondiente locus genómico puede suministrar información acerca de la localización precisa de las secuencias interpuestas no codificantes dentro del DNA. En proyectos más prácticos, el DNAc purificado se puede secuenciar con facilidad para abreviar la determinación de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido; el DNAc marcado se utiliza como sonda para detectar secuencias complementarias entre clones recombinantes; y debido a la falta de intrones, el DNAc tiene una ventaja sobre fragmentos genómicos cuando se intenta sintetizar proteínas eucariotas en cultivos de células bacterianas.

Clonación expresada

Un procedimiento alternativo para identificar una placa fago que contiene un DNAc particular se denomina *clonación expresada*. En esta técnica, el DNAc que debe clonarse se introduce por delante de un promotor bacteriano fuerte, lo que garantiza que el DNA extraño será transcrito y traducido durante el proceso infeccioso. Así, aquellos fagos que originalmente incorporan el gen buscado formarán placas que contienen la proteína codificada por dicho gen. La identificación de las placas que contienen el gen se lleva a cabo sobre placas duplicadas preparadas, como se describió con anterioridad, utilizando una sonda marcada que se une específicamente a la proteína codificada. Las sondas empleadas más comúnmente para encontrar una proteína deseada son anticuerpos formados contra dicha proteína. Una vez localizada una placa sobre la réplica el gen, se puede aislar de los virus sobre la placa original.

Síntesis química y mutagénesis dirigida a un sitio

El desarrollo de técnicas químicas para sintetizar polinucleótidos con una secuencia de bases específica se inició con los trabajos de H. Gobind Khorana a principios del decenio de 1960 como parte de un proyecto para descifrar el código genético. Khorana y sus colaboradores continuaron perfeccionando sus técnicas y casi 10 años después de su trabajo inicial acerca del código lograron sintetizar un gen de RNAt completo de una tirosina bacteriana, incluyendo la región promotora no transcrita. El gen, en total 126 pares de bases, se reunió a partir de 20 segmentos, cada uno de los cuales se sintetizó individualmente y luego se juntaron por métodos enzimáticos. A continuación, este gen artificial se introdujo en células bacterianas portadoras de mutaciones para este RNAt y el DNA sintético pudo realizar la función previamente deficiente.

Un segundo acontecimiento importante en el campo de la síntesis de genes se produjo en 1977 cuando Keiichi Itakura y sus colaboradores, del City of Hope Medical Center, sintetizaron un gen que codifica la hormona somatostatina, un pequeño péptido hipotalámico (14 residuos de aminoácidos). El gen se introdujo por delante de un plásmido especialmente elaborado a partir de secuencias bacterianas reguladoras dentro de *E. coli*, donde fue transcrito y traducido. En 1981 se sintetizó un gen para la primera proteína "de tamaño promedio", el interferón humano, esfuerzo que requirió la síntesis y ensamblado de 67 fragmentos diferentes para producir un solo dúplex de 514 pares de bases con señales de inicio y terminación reconocidas por la RNA polimerasa bacteriana.

El desarrollo de los procedimientos químicos requeridos para el ensamblado de nucleótidos condujo en los últimos 10 años, aproximadamente, a la construcción de máquinas automatizadas para sintetizar DNA capaces de sintetizar polinucleótidos de cualquier secuencia deseada (o secuencias generadas al azar) de unos 75 nucleótidos de longitud. Una vez sintetizados estos fragmentos se pueden enlazar entre sí mediante uniones covalentes para generar moléculas de DNA sintéticas de longitud considerable.

La técnica desarrollada para la síntesis química de DNA también es muy valiosa porque permite a los investigadores modificar la secuencia de nucleótidos en elementos genéticos que ocurren en la naturaleza. A diferencia de sus colegas que trabajan con bacterias, los genetistas han tenido poca suerte en el aislamiento de mutantes de genes eucariotas que contengan alteraciones en las secuencias promotoras, terminadoras u otras reguladoras. Utilizando técnicas *in vitro*, se pueden borrar pequeñas porciones de una secuencia de DNA, introducir nucleótidos adicionales, o se puede cambiar una base específica por otra. Este procedimiento, desarrollado por Michael Smith, de la University of British Columbia, se denomina **mutagénesis dirigida a un sitio (SDM)**. De ordinario, la técnica SDM se realiza sintetizando primero un oligonucleótido de DNA que contiene la modificación deseada, hibridando este oligonucleótido con el DNA normal y a continuación utilizando el oligonucleótido como iniciador para la polimerasa de DNA. La polimerasa alarga al iniciador añadiendo nucleótidos complementarios al DNA normal. Los pedazos de DNA modificado pueden entonces clonarse y determinar el efecto de la alteración genética introduciendo el DNA en una célula huésped apropiada. Si el sitio bajo investigación es parte de una región reguladora, entonces se puede observar el efecto de la alteración sobre la tasa de expresión del gen. Si el sitio se localiza dentro de la región codificante de un gen, la alteración resultante en la secuencia de aminoácidos suministra conocimientos acerca del papel que ese sitio desempeña en la estructura total y función de la proteína.

Transferencia de genes en células eucariotas y embriones de mamífero

En secciones previas analizamos de qué manera se pueden codificar y amplificar genes eucariotas. En esta sección consideraremos alguna de las técnicas mediante las cuales se

pueden introducir dichos genes en las células eucariotas. Se dispone de algunos procedimientos para introducir DNA en células cultivadas, proceso denominado **transfección**. Es muy frecuente que las células estén suspendidas en presencia de un fino precipitado de calcio del DNA. Se estima que sólo una célula en 10^5 a 10^6 capta el DNA y lo incorpora de manera estable a los cromosomas. Se desconoce la razón de que este pequeño porcentaje de células de la población sean competentes para ser transfectadas, pero aquellas que lo son por lo general captan varios fragmentos. Una manera de seleccionar las células que captan el DNA extraño es incluir un gen que permita desarrollar las células transfectadas en un medio particular en el cual no puedan sobrevivir células no transfectadas. Puesto que las células transfectadas por lo general captan más de un fragmento, el gen empleado para la selección no debe localizarse sobre el mismo fragmento de DNA que el gen cuyo papel se investiga (llamado **transgen**).

Otro procedimiento para lograr la transfección de células vegetales y animales se denomina **electroporación**. En este procedimiento, las células se incuban con DNA en frascos especiales que contienen electrodos capaces de aplicar un breve choque eléctrico. Al aplicar la corriente, la membrana plasmática transitoriamente se hace permeable a las moléculas de DNA, algunas de las cuales llegan hasta el núcleo y se integran a los cromosomas.

Una de las maneras más directas de introducir genes extraños en una célula es la microinyección directa de DNA dentro del núcleo de las células. Los núcleos de oocitos y de óvulos son particularmente adecuados para esta técnica. Por ejemplo, los oocitos de *Xenopus* se utilizan desde hace mucho tiempo para estudiar la expresión de genes extraños. El núcleo del oocito contiene todo el mecanismo necesario para la síntesis de RNA; cuando se inyecta DNA extraño dentro del núcleo, se transcribe con facilidad. Además, el RNA sintetizado por las plantillas inyectadas se procesa y transporta normalmente al citoplasma, donde se traduce en proteínas que pueden detectar el sistema inmunológico gracias a su actividad específica (fig. VE 4-6).

Otro "blanco" favorito para el DNA inyectado es el núcleo de un embrión de ratón (fig. 17-39). La meta de tales experimentos no es observar la expresión del gen en la célula inyectada, sino integrar el DNA extraño en los cromosomas del óvulo para que pasen a todas las células del embrión y al adulto subsecuente. Los animales manipulados genéticamente de modo que sus cromosomas contengan genes extraños se denominan **animales transgénicos**, y suministran un medio para observar cuándo y dónde se expresan los genes en el embrión particular (como en la figura 12-41), y para determinar el impacto de copias extra de genes particulares sobre el desarrollo y la vida del animal.

Animales y plantas transgénicos

En 1981, Ralph Brinster, de la Universidad de Pennsylvania, y Richard Palmiter, de la Universidad de Washington, produjeron los primeros animales transgénicos. Introdujeron con éxito un gen de rata para hormona de crecimiento (GH) en óvulos fertilizados de ratones. El DNA inyectado se elaboró de manera que contenía la porción codificante del gen GH de rata en una posición justo adelante de la región promoto-

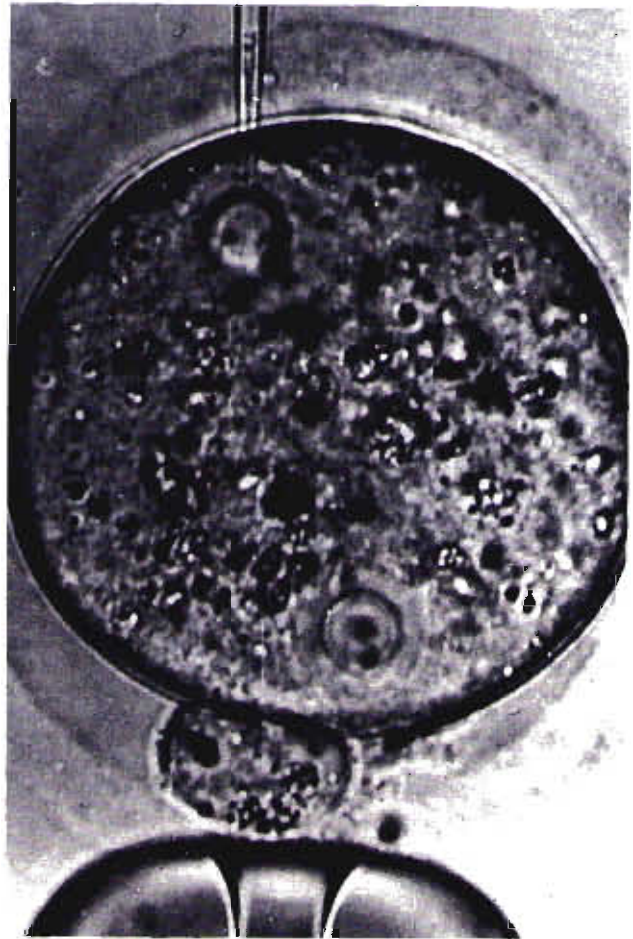


FIGURA 17-39. Microinyección de DNA dentro del núcleo de un óvulo de ratón recién fertilizado. Los óvulos se colocan en su sitio mediante pipeta de succión, mostrada en la parte de abajo, en tanto que la pipeta de inyección se muestra en el momento de penetrar al óvulo en la parte de arriba de la figura. (Según Thomas E. Wagner y cols. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:6377, 1981.)

ra del gen metalotioneína del ratón. En condiciones normales, la síntesis de metalotioneína aumenta mucho luego de administrar metales como cadmio o zinc, u hormonas glucocorticoides (pág. 517). El gen metalotioneína contiene un fuerte promotor y la expectativa era que colocando el gen GH por delante de dicho promotor, el gen GH sería expresado luego del tratamiento de los ratones transgénicos con metales o glucocorticoides. Como se ilustra en la figura 17-40, esta expectativa se cumplió totalmente.

La formación de animales transgénicos constituye un medio útil para determinar los efectos de la expresión excesiva de una secuencia de DNA particular. Un ejemplo de este tipo de experimento se ilustra en la figura 9-47, que muestra una sección de la médula espinal de un ratón que expresa de manera excesiva el gen de uno de los péptidos que forman neurofilamentos. La sobreexpresión del gen conduce a un tipo de degeneración neurológica que recuerda lo que ocurre en la enfermedad humana esclerosis lateral amiotrófica (ELA).



FIGURA 17-40. Ratones transgénicos. Esta fotografía muestra un par de miembros de la misma camada a la edad de 10 semanas. El ratón de mayor tamaño fue desarrollado a partir de un óvulo al cual se inyectó DNA con gen para hormona del crecimiento de rata colocada hacia adelante del promotor metalotioneína. El ratón más grande pesa 44 g; el ratón testigo no inyectado y de menor tamaño pesa 29 g. El gen de rata GH fue transmitido a los descendientes que crecieron mucho más que los testigo. (Cortesía de Ralph L. Brinster, según el trabajo comunicado de R.D. Palmiter y cols. *Nature* 300:611, 1982.)

Este último ejemplo ilustra de qué manera la ingeniería genética puede producir **modelos animales**, animales de laboratorio que padecen una enfermedad humana particular que en condiciones normales no padecen. También se han desarrollado animales transgénicos como parte de la biotecnología agropecuaria. Por ejemplo, los cerdos a los que se incorpora hormona del crecimiento extraña en sus cromosomas, se desarrollan con mucho menos grasa que los animales testigo que carecen de dichos genes. La carne de los animales transgénicos es magra porque el exceso de hormona de crecimiento estimula la conversión de nutrientes en proteínas en vez de grasas.

Las plantas son candidatos principales para la ingeniería genética. En la página 514, se indicó que se pueden cultivar plantas completas a partir de cultivo de células de plantas individuales. Esto brinda la oportunidad de alterar la composición genética de plantas introduciendo DNA en el cromosoma de células cultivadas que posteriormente pueden desarrollarse en plantas maduras. Una manera de introducir genes extraños es incorporarlos en el *plásmido Ti* de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (fig. 17-41). Fuera del laboratorio, esta bacteria vive en asociación simbiótica con plantas dicotiledóneas, donde forman masas tumorales llamadas crestas de gallo. Durante una infección, el plásmido Ti pasa de la bacteria al interior de la célula vegetal donde se incorpora a los cromosomas e induce a la célula a proliferar y suministrar nutrientes para la bacteria. El plásmido Ti se puede aislar de bacterias y unir con genes extraños para

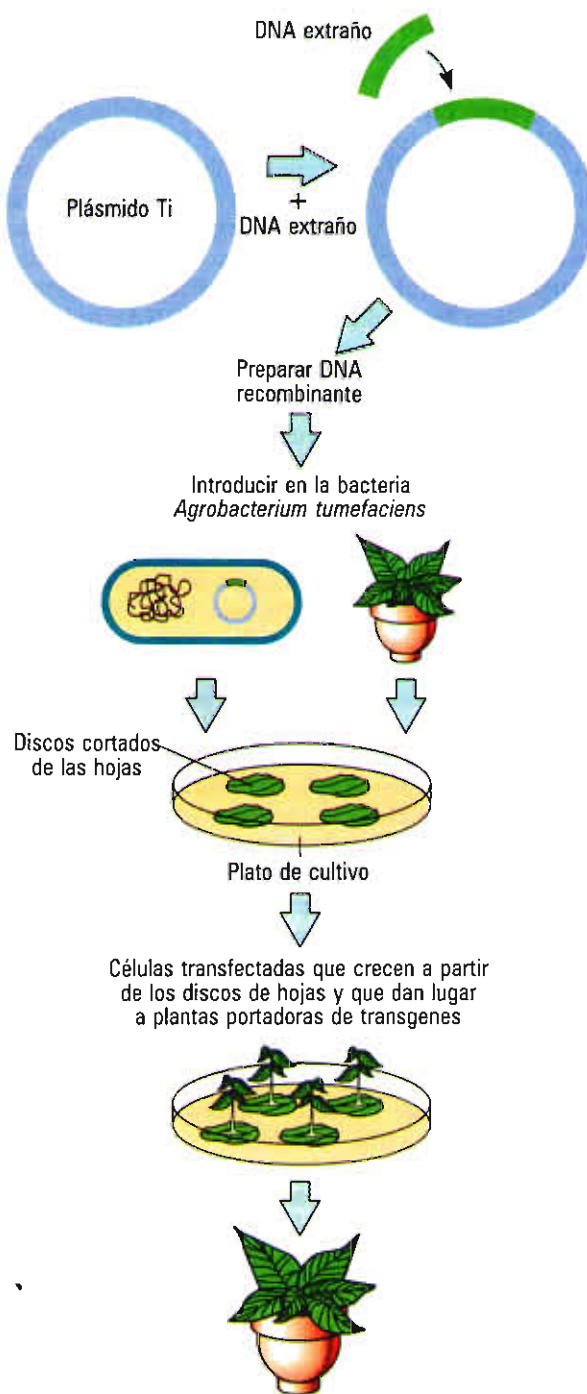


FIGURA 17-41. Formación de plantas transgénicas utilizando el plásmido Ti. El transgen se separa en el DNA del plásmido Ti, que a continuación se puede emplear para transfectar células que son parte de discos cortados en las hojas de la planta. A continuación las células transfectadas pueden crecer para formar plantas íntegras.

producir un plásmido recombinante que pueda ser captado por células indiferenciadas de plantas dicotiledóneas cultivadas, incluyendo zanahorias y tabaco. Esta técnica, denominada *transformación T-DNA*, se emplea para la transfección de células vegetales con genes derivados de bacterias que

codifican toxinas para matar insectos, y por lo tanto protegen a las plantas de insectos depredadores.

En la actualidad se están desarrollando otros procedimientos para introducir genes extraños en células de plantas monocotiledóneas. En una de las técnicas más exóticas, las células vegetales pueden servir como "blanco" para esferillas microscópicas de DNA recubiertas con tungsteno y disparadas con una "pistola de genes". Esta técnica se emplea para transfectar algunos tipos diferentes de células vegetales.

Las dos actividades más importantes que los genetistas de plantas esperan mejorar con estas maniobras de ingeniería genética son la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno, ambas funciones cruciales desde el punto de vista bioenergético. Cualquier mejora significativa en la eficiencia de las plantas para efectuar la fotosíntesis significa un gran incremento en la producción de cosechas. Como se analiza en *La perspectiva humana* del capítulo 6, se espera que una versión modificada de la enzima fijadora de CO_2 se pueda manipular genéticamente de modo que sea menos susceptible a la fotorrespiración. La fijación de nitrógeno es una actividad realizada por ciertos géneros de bacterias (p. ej., *Rhizobium*) que viven en relación simbiótica con ciertas plantas (p. ej., frijol de soya, cacahuates, trébol, alfalfa y guisantes). La bacteria reside en hinchazones, o *nódulos leguminosos*, localizados en las raíces, donde eliminan N_2 de la atmósfera, lo reducen a amonio y entregan el producto a las células de la planta. Se espera aislar los genes que participan en esta actividad a partir del genoma bacteriano e introducirlos en los cromosomas de plantas no leguminosas que en la actualidad dependen en gran medida de la adición de fertilizantes para reducir sus compuestos nitrogenados. Alternativamente, quizá sea posible alterar el genoma de cualquier planta o bacteria de modo que se puedan desarrollar nuevos tipos de relaciones simbióticas.

Ratones knockout. En algunos puntos de este texto describimos el uso de ratones que carecen de un gen funcional que normalmente contienen. Por ejemplo, se hizo notar que los ratones que carecen de una copia funcional del gen para la proteína PrP no pueden desarrollar el prión de la enfermedad encefalitis espongiforme (pág. 25), en tanto que los ratones que carecen de un gen *p53* funcional casi con certeza desarrollan tumores malignos. Estos animales, que se denominan **ratones knockout**, suministran una perspectiva única de las bases genéticas de una enfermedad humana, y también un mecanismo para estudiar las diferentes actividades celulares en las que puede participar el producto de un gen particular. Los ratones knockout nacen como consecuencia de una serie de procedimientos experimentales mostrados en la figura 17-42.

El primer paso es aislar un tipo muy poco habitual de célula que prácticamente tiene potencial ilimitado de diferenciación. Estas células, llamadas **células de estirpe embrionaria**, se encuentran en blastocitos de mamíferos, que es una de las primeras etapas del desarrollo embrionario comparable a la blástula de otros animales. Un blastocito de mamífero (fig. 17-42) se compone de dos partes distintas: una delgada capa externa de células y una masa interna de células. La capa externa constituye el *trofotodermo*, que da lugar a la mayor parte de las membranas extraembrionarias características del embrión de mamífero. La superficie interna del

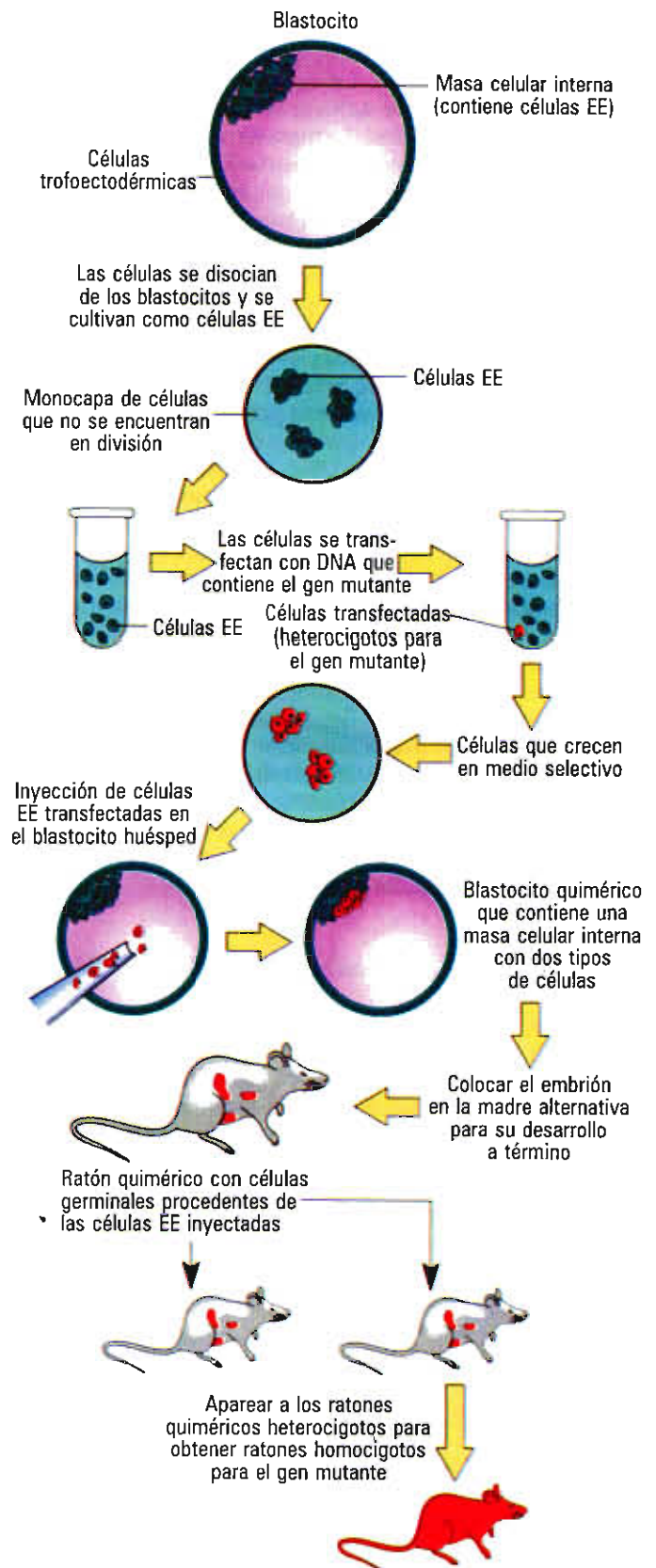


FIGURA 17-42. Formación de ratones knockout. Los pasos se describen en el texto.

trofotodermo entra en contacto con el grupo de células llamado *masa de células internas*, que se prolonga al interior de la cavidad (blastocelo). La masa de células internas es la parte del blastocito que da lugar a las células que constituyen el embrión del mamífero. La masa de células internas contiene las células de estirpe embrionaria (EE) capaces de diferenciarse en los diferentes tejidos que contiene un mamífero.

Las células EE se pueden aislar de blastocitos y cultivar *in vitro* en condiciones que favorecen el crecimiento y proliferación de las células. Las células EE se transfectan entonces con fragmentos de DNA que contengan un alelo mutante del gen que se quiere alterar, y también genes que se puedan usar para seleccionar las células que han incorporado el DNA alterado en su genoma. De las células que captan el DNA, aproximadamente una por cada 10^4 sufre un proceso de *recombinación homóloga* en el cual el DNA transfectado sustituye la secuencia de DNA homóloga que contiene el alelo normal. Mediante este procedimiento se producen células EE heterocigotas para el gen en cuestión y luego se seleccionan según su resistencia a fármacos. El siguiente paso es inyectar algunas de estas células EE dentro del blastocelo del blastocito de un ratón e implantar el embrión inyectado en el oviducto de un ratón hembra hormonalmente preparada para llevar el embrión a término. Conforme el embrión se desarrolla en su madre alternativa, las células EE inyectadas se unen a la masa de células internas del propio embrión y contribuyen a la formación de los tejidos embrionarios, incluyendo las células germinales de las gónadas. Las crías de estos ratones son heterocigotos para el gen en cuestión y se pueden aparear entre sí para producir descendientes homocigotos para el alelo mutante. Estos ratones carecen ahora de una copia funcional del gen.

Amplificación enzimática de DNA por RCP

En 1983, Kary Mullis, de Cetus Corporation, desarrolló una nueva técnica que en la actualidad se usa ampliamente para amplificar un fragmento de DNA específico sin necesidad de células bacterianas. Se sabe que la polimerasa de DNA de especies de bacterias que viven en fuentes termales es estable a temperaturas de 90°C , muy por encima de la temperatura que destruye la actividad de otras polimerasas de DNA. Mullis y sus colaboradores aprovecharon esta enzima para desarrollar la técnica **reacción en cadena de la polimerasa (RCP)**, en la cual una sola región de DNA, que a veces se presenta fugazmente en mínimas cantidades, se puede amplificar con rapidez y poco costo.

En la figura 17-43 se muestra el procedimiento básico empleado en la reacción en cadena de la polimerasa. Una muestra de DNA se mezcla con los cuatro desoxirribonucleótidos y una polimerasa de DNA resistente a temperatura, junto con los dos fragmentos de DNA sintéticos cortos (oligonucleótidos) complementarios de las secuencias de DNA en los extremos 3' de la región de DNA que se desea amplificar. Los oligonucleótidos sirven como iniciadores (pág. 553) a los cuales se añaden los nucleótidos durante los pasos de duplicación descritos a continuación. La mezcla se calienta a $92\text{--}94^{\circ}\text{C}$, lo bastante caliente para separar las moléculas de DNA de la muestra en sus cadenas compo-

nentes. A continuación se enfría la mezcla para permitir que los iniciadores se enlacen a los extremos 3' de ambas cadenas del DNA específico y la polimerasa añada nucleótidos a los extremos 3' de los iniciadores. A medida que la polimerasa alarga los iniciadores, copiando selectivamente el DNA específico, forma nuevas cadenas de DNA complementarias. Elevando una vez más la temperatura, las cadenas de DNA originales y las recién formadas se separan. En seguida se enfría la muestra para permitir que los iniciadores sintéticos en la mezcla se unan una vez más a los extremos 3' del DNA específico, que ahora está presente en cantidad doble de la original. Este ciclo se repite una y otra vez, y en cada ocasión se duplica la cantidad de la región de DNA específica flanqueada por los iniciadores enlazados. En unas cuantas horas se pueden generar miles de millones de copias de esta región específica.

Además de emplearse para amplificar fragmentos de DNA específicos, la RCP puede generar grandes cantidades de DNA a partir de muestras mínimas. Por ejemplo, la técnica de RCP se puede usar en la investigación de crímenes para producir cantidades detectables de DNA a partir de una diminuta mancha de sangre seca encontrada en las ropas del sospechoso o incluso a partir del DNA presente en alguna parte de un solo folículo piloso hallado en la escena del crimen.

Secuencias de DNA

En 1970 se había determinado la secuencia de aminoácidos de una larga lista de proteínas, pero prácticamente no se había progresado en la secuencia de nucleótidos de DNA. Había varias razones para este estado de cosas. A diferencia de las moléculas de DNA, los polipéptidos tienen longitud definida y manejable; una especie determinada de polipéptidos se puede purificar con facilidad; se dispone de varias técnicas para desdoblar el polipéptido en diferentes sitios y producir fragmentos superpuestos, y la presencia de 20 aminoácidos diferentes con propiedades muy diversas hace de la separación y secuenciamiento de péptidos pequeños una tarea sin grandes complicaciones. Entonces, a mediados del decenio de 1970, ocurrió una revolución en la tecnología para secuenciar DNA; en 1977 se publicó la secuencia completa de nucleótidos de un genoma viral entero, el de ϕX174 de unos 5 375 nucleótidos de longitud. Este acontecimiento decisivo en biología molecular se logró en el laboratorio de Frederick Sanger, quien 25 años antes había determinado la primera secuencia de aminoácidos de un polipéptido (insulina).

En 1970, secuenciar un segmento de DNA de unas pocas docenas de nucleótidos de longitud podía tomar un año; 15 años después, la misma tarea se pudo lograr en un solo día. Esta situación cambió gracias a varios avances notables. De mayor importancia fue la disponibilidad de enzimas restrictivas que suministraron los medios necesarios para preparar una población de fragmentos de DNA pequeños definidos. Después, con el advenimiento de la tecnología para clonación de DNA, cualquier fragmento determinado se pudo amplificar enormemente para producir material suficiente y efectuar los procedimientos bioquímicos nece-

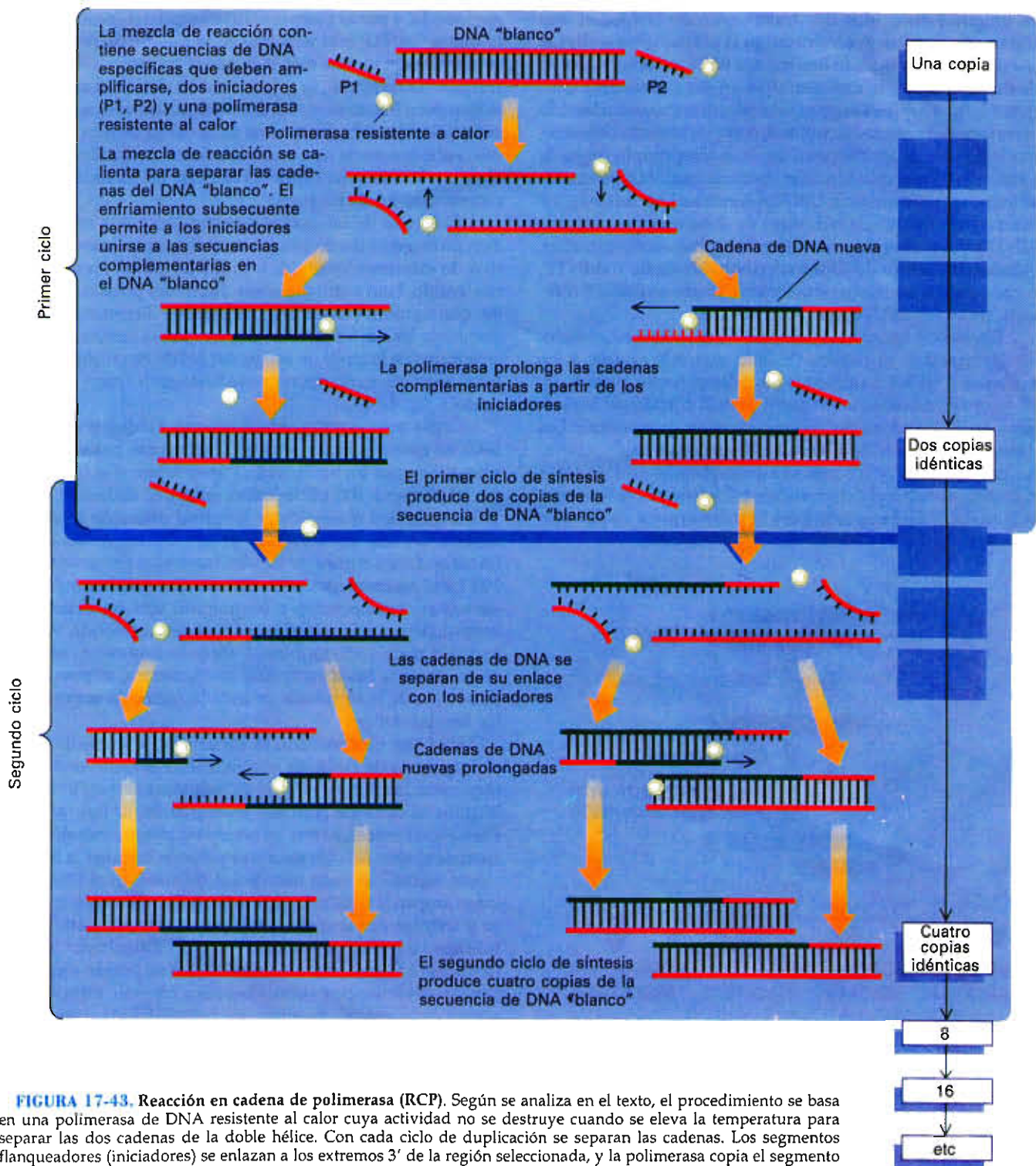


FIGURA 17-43. Reacción en cadena de polimerasa (RCP). Según se analiza en el texto, el procedimiento se basa en una polimerasa de DNA resistente al calor cuya actividad no se destruye cuando se eleva la temperatura para separar las dos cadenas de la doble hélice. Con cada ciclo de duplicación se separan las cadenas. Los segmentos flanqueadores (iniciadores) se enlazan a los extremos 3' de la región seleccionada, y la polimerasa copia el segmento interpuesto.

sarios. Pero además de estos avances, fue necesaria una nueva metodología de secuenciamiento independiente de la generación de fragmentos superpuestos, como se requiere en el secuenciamiento de polipéptidos. Casi simultáneamente se desarrollaron dos técnicas diferentes, una por Sanger y A.R. Coulson, del Medical Research Council en Cambridge,

Inglaterra, y la otra por Allan Maxam y Walter Gilbert, de Harvard University. En esta sección consideraremos brevemente la técnica Sanger-Coulson (o técnica dideoxi), que es la más ampliamente utilizada.

Este procedimiento se inicia con una población de fragmentos de DNA idénticos hasta de casi 500 pares de bases

de longitud obtenidos por tratamiento de DNA con una enzima restrictiva. A continuación la preparación se divide en cuatro muestras, cada una tratada de manera ligeramente distinta. El DNA se desnaturaliza en sus cadenas simples (paso 1, fig. 17-44) y luego se incuba con un oligonucleótido corto marcado con radiactividad, complementario del extremo 3' de uno de los fragmentos de cadena simple (paso 2). La mezcla de reacción también contiene una DNA polimerasa (con mayor frecuencia, DNA polimerasa I bacteriana), los cuatro precursores de trifosfato de desoxirribonucleósido (dNTP) y un precursor modificado en baja concentración, llamado **trifosfato de didesoxirribonucleósido**, o ddNTP. A cada una de las cuatro muestras se añade un ddNTP diferente (ddATP, ddCTP, ddTTP o ddGTP).

Cuando se incuban las mezclas de reacción en condiciones apropiadas, el oligonucleótido marcado se une a los extremos 3' de los fragmentos de cadena simple (paso 3, fig. 17-44) y sirven como iniciadores para la adición de nucleótidos en una cadena complementaria en crecimiento. Los didesoxirribonucleótidos carecen de un grupo hidroxilo en las posiciones 2' y 3'; una vez incorporado uno de estos nucleótidos sobre el extremo de una cadena en crecimiento, la falta del 3' OH imposibilita a la polimerasa a añadir otro

nucleótido, y por lo tanto concluye la cadena (paso 4). Puesto que el ddNTP está presente en la mezcla de reacción en concentración mucho más baja que la concentración del correspondiente dNTP, la incorporación del didesoxinucleótido es poco frecuente y al azar; se puede incorporar cerca del principio de una cadena, cerca de la mitad de otra cadena o hasta el extremo de una tercera cadena. Cualquiera que sea el punto donde se incorpora el ddNTP, el crecimiento de la cadena cesa en dicho punto.

Cada una de las cuatro muestras contiene una población de fragmentos de DNA incompletos con marca radiactiva de diferente longitud, y todos terminan en el mismo nucleótido. Las cuatro muestras diferentes poseen fragmentos que terminan en cuatro nucleótidos distintos. Los productos de las cuatro mezclas de reacción se cargan en pozos separados en la parte de arriba del gel de electroforesis y se fraccionan en sus componentes a lo largo de líneas paralelas (paso 5, fig. 17-44).

Como se hizo notar anteriormente, mediante electroforesis en gel se pueden separar fragmentos cuya longitud sólo difiere por un nucleótido. Por ejemplo, si el fragmento inicial contiene 100 nucleótidos, entonces cada uno de los 100 fragmentos marcados de longitud diferente se desplazarán a un sitio específico en el gel; dentro de las cuatro líneas se deben encontrar bandas marcadas presentes en las 100 localizaciones posibles. Puesto que bandas marcadas sucesivas corresponden a fragmentos con un extremo 5' común, pero con longitud mayor por un nucleótido, y puesto que el nucleótido terminal 3' de cada fragmento se conoce gracias a la línea en la cual se encuentra, se puede leer directamente la secuencia de toda la molécula exponiendo las bandas del gel.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos de un segmento de DNA, es relativamente sencillo deducir la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado utilizando la carta de codones mostrada en la figura 11-41. Para lograr este objetivo, es necesario determinar en la secuencia el sitio donde comienza y donde termina la traducción e identificar cada uno de los intrones en el DNA que interrumpen la codificación. Puesto que cada intrón comienza y termina con una secuencia precisa de nucleótidos, los intrones se pueden identificar sin gran dificultad. Una vez deducida la secuencia de aminoácidos se puede comparar con otras secuencias conocidas para obtener información acerca de la posible función del polipéptido. La secuencia de aminoácidos también suministra indicios acerca de la estructura terciaria de la proteína, particularmente aquellas partes del polipéptido que pueden actuar como segmentos que atraviesan la membrana en proteínas integrales de membrana. Como se analizó en *La perspectiva humana* del capítulo 10, la tecnología para secuenciar DNA se usa en la actualidad como parte de un proyecto de cooperación a través de todo el mundo para determinar la secuencia de nucleótidos del genoma humano completo.

17-13 Uso de anticuerpos

Según se estudió en el capítulo 2, los anticuerpos son proteínas producidas por tejidos linfoides en respuesta a la pre-

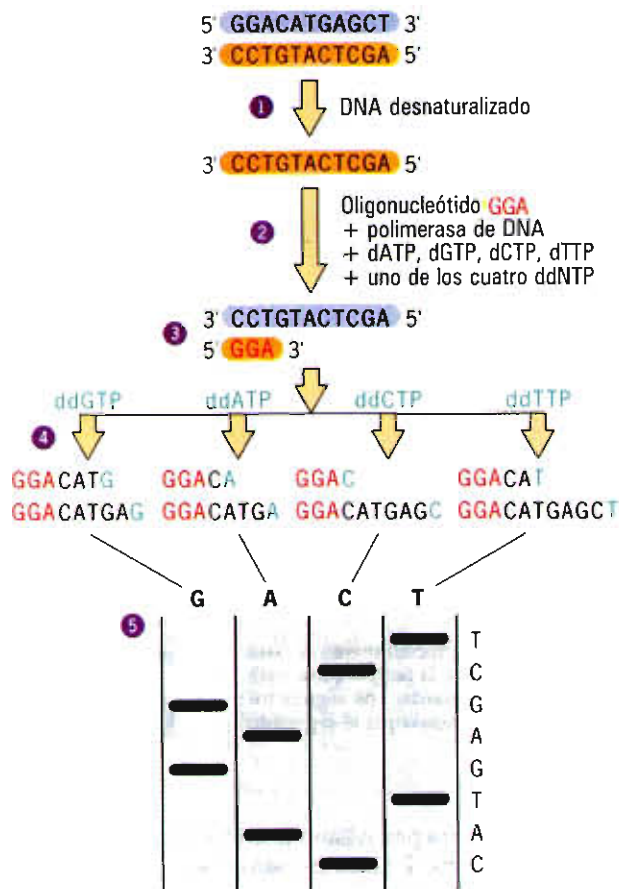


FIGURA 17-44. Secuenciación de DNA. Secuenciación de un pequeño fragmento hipotético mediante la técnica Sanger-Coulson (dideoxi), según se describe en el texto.

sencia de materiales extraños, o antígenos. Una de las propiedades más notables de los anticuerpos, que les confiere su gran utilidad en investigación biológica, es su notable especificidad. Una célula puede contener miles de proteínas diferentes, pero una preparación de anticuerpos sólo se enlaza a aquellas moléculas seleccionadas dentro de la célula que tenga una pequeña porción capaz de ocupar el sitio de enlace del antígeno en la molécula del anticuerpo. Con frecuencia se obtienen anticuerpos capaces de distinguir entre dos polipéptidos que sólo difieren por un aminoácido.

Los biólogos han sacado gran provecho de la existencia de los anticuerpos y han desarrollado una amplia variedad de técnicas para utilizarlas. Básicamente hay dos diferentes métodos para preparar moléculas de anticuerpos capaces de interactuar con un antígeno determinado. En el método tradicional, se inyecta repetidamente a un animal (de ordinario un conejo o una cabra) con el antígeno y después de un periodo de varias semanas se le extrae sangre que contiene los anticuerpos deseados. Esta sangre íntegra se somete a tratamiento para eliminar células y factores de coagulación y producir un **antisuero**, en el cual se pueden ensayar sus títulos de anticuerpos y a partir del cual se pueden purificar inmunoglobulinas. Aunque este método de producción de anticuerpos todavía se usa, tiene ciertas desventajas inherentes. Como resultado del mecanismo de síntesis de anticuerpos (estudiado en la página 515), un animal invariablemente produce gran variedad de especies diferentes de inmunoglobulinas, o sea, inmunoglobulinas con regiones V distintas en sus cadenas de polipéptidos, aunque se prepare a base de un antígeno altamente purificado. Si el antisuero contiene varias inmunoglobulinas capaces de enlazarse al mismo antígeno, se dice que es *polivalente*. Puesto que las inmunoglobulinas que deben fraccionarse son tan similares en estructura, a veces es imposible utilizar técnicas estándar para obtener una preparación con una sola especie de anticuerpo purificado mediante esta técnica.

En 1975, Cesar Milstein y George Köhler, del Medical Research Council en Cambridge, Inglaterra, efectuaron algunos experimentos cruciales que condujeron al desarrollo de preparaciones monovalentes de anticuerpos. Para comprender este trabajo, es necesario hacer un breve paréntesis. Un clono determinado de células productoras de anticuerpos (derivada de un sólo linfocito B) produce anticuerpos con sitios idénticos para combinarse con antígenos, o sea, anticuerpos con las mismas regiones V de una molécula a otra. La heterogenicidad de los anticuerpos producidos cuando se inyecta un solo antígeno purificado a un animal se debe a la activación de muchos linfocitos B diferentes, cada uno con anticuerpos enlazados en su membrana con diferente afinidad para diferentes partes del antígeno. Se plantea una pregunta importante: ¿será posible superar este problema y obtener una sola especie de molécula de anticuerpo? Consideremos por un momento los resultados de un procedimiento en el cual se inyecta a un animal un antígeno purificado, se espera un periodo de semanas para que los anticuerpos se produzcan, se retira el bazo u otros tejidos linfoides, se prepara una suspensión de células aisladas, se aíslan las células capaces de producir el anticuerpo deseado y estas células particulares se cultivan como colonias separa-

das para obtener grandes cantidades de la inmunoglobulina particular. Si se siguiera este procedimiento, se obtendría una preparación de moléculas de anticuerpos producidos por una sola colonia (o clono) de células, conocida como **anticuerpo monoclonal**. Infortunadamente, las células productoras de anticuerpo no crecen ni se dividen en cultivo,

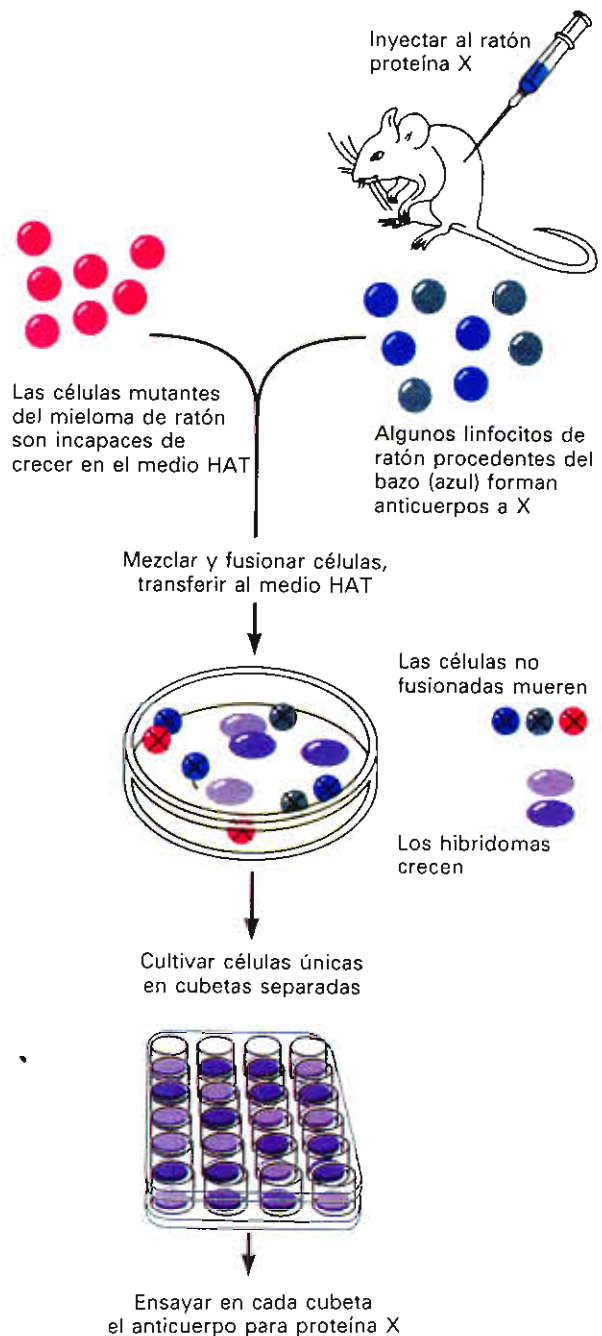


FIGURA 17-45. Procedimiento empleado en la formación de anticuerpos monoclonales. El medio HAT debe su nombre a que contiene hipoxantina, ametofterina y timina. Este medio permite crecer a las células con una hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT) funcional, pero no apoya el crecimiento de las células que carecen de esta enzima, como las células de mieloma no fusionadas empleadas en este procedimiento.

por lo que se debe introducir algún tipo de manipulación adicional para obtener anticuerpos monoclonales.

En la página 64 se mencionó que existe un tipo de célula maligna, célula del mieloma, que crece rápidamente en cultivo y continúa produciendo grandes cantidades de anticuerpos. Sin embargo, aunque las moléculas de anticuerpo producidas por células de mieloma son de gran valor en el estudio de anticuerpos, tienen poca aplicación como herramientas analíticas porque se forman en respuesta a la presencia de un antígeno particular. Las células del mieloma más bien se desarrollan a partir de la conversión al azar de un linfocito normal al estado maligno y, por lo tanto, producen el anticuerpo que el linfocito particular sintetiza antes de malignizarse.

Milstein y Köhler combinaron estos dos tipos de células, el linfocito normal productor de anticuerpos y la célula del mieloma maligno. Lograron esta hazaña fusionando los tipos de células para producir células híbridas, denominadas **hibridomas**, que crecen y proliferan produciendo gran cantidad de un anticuerpo único (monoclonal). El anticuerpo producido es el sintetizado por el linfocito normal antes de fundirse con la célula del mieloma.

El procedimiento para producir anticuerpos monoclonales se ilustra en la figura 17-45. El antígeno (presente en forma soluble o como parte de una célula intacta) se inyecta a un ratón para provocar la proliferación de células formadoras de anticuerpos específicos. A continuación se retira el bazo y los linfocitos fusionados con una población de células malignas de mieloma, que confieren inmortalidad a los híbridos, o sea, la propiedad de efectuar divisiones celulares indefinidas. Los híbridos se seleccionan de células no fusionadas por su capacidad para crecer en cierto medio y a continuación se detectan individualmente por la producción de anticuerpos contra el antígeno estudiado. Las células híbridas que contienen el anticuerpo apropiado pueden a continuación clonarse *in vitro* o *in vivo* (porque crecen como células tumorales en un animal receptor), y se pueden preparar grandes cantidades del anticuerpo monoclonal.

Una de las características más importantes de esta metodología es que no es necesario iniciar con un antígeno purificado para obtener un anticuerpo. En realidad, el antígeno contra el cual se busca producir un anticuerpo monoclonal puede ser incluso un componente menor de toda la mezcla. Por ejemplo, consideremos el experimento mostrado en la figura 4-30. Estas micrografías fluorescentes muestran el enlace de tres anticuerpos diferentes a diversos antígenos sobre la superficie de un espermatozoide. En este experimento, los antígenos que deben determinarse nunca

fueron purificados y son de naturaleza desconocida. Los anticuerpos se produjeron por inyección de extractos crudos de espermatozoides al animal del cual se prepararon posteriormente los linfocitos del bazo. Después de obtener un anticuerpo monoclonal se puede utilizar en subsecuentes etapas para aislar antígeno purificado mediante cromatografía por afinidad. Además de su uso en investigación, los anticuerpos monoclonales desempeñan un papel valioso en diagnóstico médico como pruebas para determinar la concentración de proteínas específicas en sangre u orina. Por ejemplo, una concentración inusualmente alta de antígeno prostático específico (APE), que se mide por su interacción con un anticuerpo monoclonal, proporciona el primer indicio de que un paciente varón puede estar desarrollando cáncer de próstata.

Con una preparación de moléculas de anticuerpos a la mano, obtenida mediante técnicas inmunológicas convencionales o con el empleo de hibridomas, estas moléculas se pueden usar como sondas altamente específicas para investigar la presencia del antígeno correspondiente mediante varias técnicas analíticas. Para utilizar anticuerpos en la localización de antígenos intracelulares, los anticuerpos deben conjugarse con una sustancia que los haga visibles, pero que no interfiera con la especificidad de sus interacciones. Para examinar con microscopio de luz, generalmente se forman complejos entre un anticuerpo y una pequeña molécula fluorescente para producir derivados que a continuación se incuban con las células o cortes de células. Los sitios de enlace se pueden observar con el microscopio de fluorescencia. Esta técnica se llama **inmunofluorescencia directa**. Casi siempre es preferible localizar un antígeno mediante una variación de esta técnica, denominada **inmunofluorescencia indirecta**. En la inmunofluorescencia indirecta, las células se incuban con anticuerpo *no marcado*, al cual se le permite formar un complejo con el antígeno correspondiente. La localización de la pareja antígeno-anticuerpo se revela a continuación en un segundo paso utilizando una preparación de anticuerpos marcados con fluorescencia cuyos sitios se dirigen contra las moléculas del anticuerpo empleado en el primer paso. La inmunofluorescencia indirecta da como resultado una imagen más brillante debido a que se pueden enlazar numerosas moléculas de anticuerpos secundarios al anticuerpo primario único. La localización del antígeno con el microscopio electrónico se logra utilizando anticuerpos marcados con materiales electrónicamente densos, como la ferritina, una proteína que contiene hierro, o con partículas de oro. En las páginas 137 y 695 se muestran ejemplos de estas técnicas.